

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO NÚCLEO DE PESQUISAS EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DO SORO DE LEITE NA SACARIFICAÇÃO  
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**MARIA ISABELLA PETRA SOUZA**

Ouro Preto, MG

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DO SORO DE LEITE NA SACARIFICAÇÃO  
ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**AUTORA:** Maria Isabella Petra Souza

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Monteze Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Ouro Preto, MG

2018

S895e Souza, Maria Isabella Petra.  
Efeito da adição do soro de leite na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar [manuscrito] / Maria Isabella Petra Souza. - 2018.  
72f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Profa. Dra. Valéria Monteze Guimarães.  
Coorientador: Profa. Dra. Rafaela Inês de Souza Ladeira Ázar.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Leite. 2. Bagaço de cana. 3. Álcool. I. Guimarães, Valéria Monteze. II. Ázar, Rafaela Inês de Souza Ladeira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 664.113



### **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 15 dias do mês de março do ano de 2018, às 14:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Maria Isabella Petra Souza, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Valeria Monteze Guimaraes (Presidente - Externo), pela Profa. Monique Renon Eller (Membro - Externo), pelo Prof. Sebastiao Tavares de Rezende (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Maria Isabella Petra Souza 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeito da Adição do Soro de Leite Na Sacarificação Enzimática do Bagaço de Cana-De-Açúcar", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Monique Renon Eller; segundo, Prof. Sebastiao Tavares de Rezende; terceiro, Profa. Valeria Monteze Guimaraes. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 15 de março de 2018.

Presidente: Valeria Monteze Guimaraes

Membro: Monique Renon Eller

Membro: Sebastiao Tavares de Rezende

Mestrando: Maria Isabella Petra Souza

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir e iluminar minha caminhada até aqui.

Aos meus pais e irmão, por me apoiarem sempre, pelo incentivo, pelos conselhos, orações, aprendizagem, paciência e carinho.

À toda minha família por torcerem por mim e apoio.

Ao Heitor pela paciência, carinho e incentivo nos momentos difíceis e pelo companheirismo fundamental durante toda essa etapa da minha vida.

Aos amigos de Viçosa e Muriaé por me incentivarem e não me deixarem desanimar ao longo desta etapa.

À professora e orientadora, Valéria Monteze Guimarães, pela paciência em ensinar, pelos conselhos, pelo carinho e incentivo.

À todos os amigos do Laboratório de Análises Bioquímicas, Mari, Camila, Polly, Amanda, Roberta, Elisa, Rafa Ventorim, Túlio, Murillo, Riziane e Lílian, pela colaboração, ajuda nos momentos complicados e por compartilharem seus conhecimentos, pela disposição em me ajudar e principalmente à Rafa Ladeira pela paciência, ensinamentos e disposição em me coorientar.

Aos professores Sebastião Rezende de Tavares e Monique Renon Eller, por se disponibilizarem a colaborar para as correções deste trabalho.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao NUPEB, em especial ao Josino, pelo suporte técnico concedido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e Ao Bioagro pela estrutura disponibilizada.

Aqueles que não citei mas que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse concluir mais essa etapa.

*“Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Toda amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos.”*

Paulo Freire.

## RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico abundante, renovável, de baixo custo e prontamente disponível para utilização na produção de químicos e produtos agroindustriais, como o etanol de segunda geração. A aplicação do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de bioetanol é influenciada por suas características estruturais e de composição química. A lignina, um dos principais componentes desta biomassa, é determinante para a recalcitrância da matéria-prima, promove a adsorção não produtiva das enzimas celulolíticas, que afeta negativamente a hidrólise enzimática do substrato. A fim de minimizar a adsorção das enzimas na estrutura lignocelulósica pode-se utilizar surfactantes ou proteínas não catalíticas que interagem com a lignina residual da biomassa, bloqueando seus possíveis sítios de interação com as enzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adsorção de proteínas não catalíticas na lignina durante a sacarificação do bagaço de cana. O bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor foi submetido à hidrólise utilizando o coquetel enzimático formado pela mistura dos extratos brutos dos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* durante 72 h, a 50 °C, na presença das proteínas não catalíticas presentes no soro de leite e a soro albumina bovina (BSA). A liberação de glicose e xilose foi quantificada por HPLC. O uso do BSA e do soro de leite precipitado ou *in natura* na concentração de 107 mg/g de lignina, promoveu aumento de 30, 26 e 53% na liberação de glicose, respectivamente. Na presença das proteínas não catalíticas, a concentração de proteínas e atividade enzimática no sobrenadante foi maior em relação ao experimento controle realizado na ausência de BSA e do soro de leite, sugerindo que as enzimas foram menos adsorvidas e mais ativas. Foi observado um aumento de aproximadamente 100% na termoestabilidade de xilanase nas 4 primeiras horas de incubação na presença do *soro in natura* e do BSA, e na presença do soro de leite precipitado, a xilanase manteve 70% de atividade durante as 72h de incubação. Estes resultados indicam que a adição das proteínas não catalíticas melhoram os rendimentos de hidrólise devido ao provável bloqueio da lignina e consequente diminuição da adsorção de enzimas na biomassa. Sendo o soro de leite uma alternativa econômica e tecnicamente viável para aumento da eficiência do coquetel enzimático dos fungos *Chrysosporthe cubensis:Penicillium pinophilum*.

## ABSTRACT

Sugarcane bagasse is an abundant, renewable, low-cost lignocellulosic material readily available for use in the production of agro-industrial chemicals and products, such as second generation ethanol. The application of sugarcane bagasse to the production of bioethanol is influenced by its structural characteristics and chemical composition. Lignin, one of the main components of this biomass, is determinant for the recalcitrance of the raw material, promotes the nonproductive adsorption of the cellulolytic enzymes, which negatively affects the enzymatic hydrolysis of the substrate. In order to minimize the adsorption of the enzymes in the lignocellulosic structure one can use non-catalytic surfactants or proteins that interact with the residual lignin of the biomass, blocking their possible sites of interaction with the enzymes. The objective of this work was to evaluate the effect of the adsorption of non - catalytic proteins on lignin during saccharification of sugarcane bagasse. The steam-blown sugarcane bagasse was subjected to hydrolysis using the enzymatic cocktail formed by mixing the crude extracts of the fungi *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* for 72 h at 50 °C in the presence of the non-catalytic proteins present in the serum of milk and bovine serum albumin (BSA). The release of glucose and xylose was quantified by HPLC. The use of BSA and the precipitated or in natura whey at the concentration of 107 mg / g lignin promoted a 30, 26 and 53% increase in glucose release, respectively. In the presence of non-catalytic proteins, the protein concentration and enzymatic activity in the supernatant was higher in relation to the control experiment performed in the absence of BSA and whey, suggesting that the enzymes were less adsorbed and more active. An approximately 100% increase in xylanase thermostability was observed within the first 4 hours of incubation in the presence of the in natura serum and BSA, and in the presence of the precipitated whey, xylanase maintained 70% activity during the 72h incubation. These results indicate that the addition of the non-catalytic proteins improves the hydrolysis yields due to the probable lignin blockade and consequent decrease of the adsorption of enzymes in the biomass. Being whey is an economical and technically feasible alternative to increase the efficiency of the enzymatic cocktail of fungi *Chrysosporthe cubensis*: *Penicillium pinophilum*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Experimento de bloqueio da lignina com diferentes concentrações de BSA, incubando ou não.....	34
<b>Figura 2:</b> Experimento de bloqueio da lignina com Soro de Leite completo e precipitado.....	37
<b>Figura 3:</b> Perfil de adsorção das enzimas durante a hidrólise do bagaço diante de do tratamento com soro de leite.....	40
<b>Figura 4:</b> Perfil de adsorção das enzimas durante a hidrólise do bagaço diante do tratamento com BSA.....	41
<b>Figura 5:</b> Termoestabilidade a 50°C das celulasas na presença as proteínas bloqueadoras.....	44
<b>Figura 6:</b> Termoestabilidade a 50°C das hemicelulasas na presença as proteínas bloqueadoras.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BDA:** Batata dextrose ágar
- BLC:** Biomassa lignocelulósica
- BSA:** Soro Albumina Bovina
- CBD:** Domínio de ligação à celulose
- CDM:** Módulo de ligação à carboidrato
- CMC:** carboximetilcelulose
- CuSO<sub>4</sub>:** Sulfato de cobre
- DNS:** ácido 3,5-dinitrosalissílico
- Etanol 2G:** Etanol de segunda geração
- FeCl<sub>3</sub>:** Cloreto férrico
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>:** Ácido bórico
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato monopotássico
- m/v:** massa/volume
- MgSO<sub>4</sub>:** Sulfato de magnésio
- MnCl<sub>2</sub>:** Cloreto de manganês
- µg:** Micrograma
- µL:** Microlitro
- µmol:** Micromol
- mL:** Mililitro
- mM:** Milimolar
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de sódio
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>:** Molibidato de sódio
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>:** Nitrato de amônio
- nm:** Nanômetro
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- ρ-NP:** ρ-nitrofenol
- ρNPβCel:** ρ-Nitrofenil-β-D-cebiosídeo
- ρNPβGal:** ρ-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
- ρNPβGlc:** ρ-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo,

**$\rho$ NP $\beta$ Xyl:**  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo

**rpm:** Rotação por minuto

**UFV:** Universidade federal de Viçosa

**USP:** Universidade de São Paulo

**v/v:** Volume/volume

**ZnSO<sub>4</sub>:** Sulfato de zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
2.1. A Biomassa lignocelulósica.....	7
2.2. Produção de bioetanol.....	8
2.3. Gargalos da produção de bioetanol.....	10
2.3.1. Pré-tratamento.....	10
2.3.2. Enzimas hidrolíticas.....	11
2.3.3. Produção das enzimas .....	12
2.3.4. Adsorção das enzimas na lignina e bloqueio .....	13
2.5. Soro de Leite .....	16
2.6. Custo de agentes bloqueadores comerciais x Custo do soro de leite.....	17
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. Delineamento experimental .....	21
4.2. Matérias-primas e reagentes.....	22
4.2.3. Produção dos extratos enzimáticos.....	23
4.3. Métodos analíticos .....	26
4.3.1. Composição do bagaço de cana-de-açúcar .....	26
4.3.2. Avaliação da atividade enzimática .....	27
4.3.2.1. Ensaio de pNP .....	27
4.3.3. Determinação da concentração de proteínas .....	28

4.3.4.	Análise da concentração de açúcares por HPLC .....	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
5.1.	Enzimas hidrolíticas presentes no blend <i>Chrysophorthe cubensis: Penicillium pinophilum</i> .....	30
5.2.	Composição do bagaço de cana-de-açúcar .....	31
5.3.	Bloqueio da lignina pela proteína não catalítica BSA .....	33
5.4.	Bloqueio da lignina com soro de leite.....	36
5.5.	Efeito das proteínas bloqueadoras sobre a estabilidade enzimática.....	39
5.6.	Proteínas totais livres antes e após a sacarificação .....	42
5.7.	Análises das atividades enzimáticas livres durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar .....	44
5.8.	Discussão geral.....	47
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

## 1- Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de produção de combustíveis e de energia limpa e segura vem ganhando força no cenário mundial, pois a dependência dos combustíveis fósseis exerce uma pressão sobre a produção desses, que são oriundos de reservas de carbono fossilizado, reservas essas limitadas e passíveis de esgotamento, causando grandes oscilações de preço deste tipo de combustível. Atrelado ao uso de combustível fóssil tem-se também, os impactos ambientais ocasionados pela emissão de dióxido de carbono e outros gases oriundos da queima deste tipo de matéria-prima (Menegol et al., 2014; Li e Zheng, 2017).

Devido à necessidade do desenvolvimento de tecnologias de processamento que permitam a produção de combustíveis, energia e produtos químicos de forma sustentável, a implementação de biorrefinarias tem sido uma alternativa de destaque, por fazerem uso da biomassa lignocelulósica derivada de resíduos agroindustriais, como a palha de arroz, palha de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar, dentre outras. Esses substratos são de origem renováveis, abundantemente disponíveis e de baixo custo (Kim e Dale, 2004; Rahikainen et al., 2013; Li e Zheng, 2017).

O Brasil tem a maior produção de cana-de-açúcar do mundo (Lima *et al.*, 2014), e uma grande quantidade de resíduo oriundo desta indústria é constantemente produzida. O bagaço de cana-de-açúcar apresenta grande potencial para a fabricação de produtos de valor agregado, como o bioetanol, que é o substituinte imediato da gasolina. Esse combustível pode ser fabricado a partir da conversão química (hidrólise ácida e outras), biológica (hidrólise enzimática, fermentação) ou termoquímica (combustão, pirólise) desta biomassa (Rocha *et al.*, 2014; Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015).

Entretanto, apesar das vantagens da produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos, como sustentabilidade do processo e facilidade de produção em larga escala, a transição da produção tradicional de combustíveis a partir de petróleo para a conversão a partir da biomassa não é simples. A biomassa lignocelulósica é uma matriz muito complexa e por isso alguns gargalos, como as etapas de pré-tratamento e

hidrólise, dificultam a produção de etanol de segunda geração de forma rentável (Gao *et al.*, 2014).

Para a obtenção do etanol 2G são necessárias algumas etapas anteriores à fermentação dos açúcares advindos da biomassa lignocelulósica, sendo elas: i) o pré-tratamento, onde a fibra celulósica é desestruturada, tornando-se acessível para a etapa seguinte; ii) a hidrólise enzimática, na qual os polímeros constituintes da biomassa são convertidos a monômeros de açúcares fermentescíveis. Após a fermentação, procede-se a destilação do etanol obtendo os produtos desejados. Em todas as etapas do processo existem limitações, entretanto as etapas de pré-tratamento e de hidrólise enzimática são as que tornam o processo mais oneroso.

O pré-tratamento é normalmente eficiente para a redução da cristalinidade da celulose e na exposição dos componentes da biomassa, porém apresenta grande custo, sendo responsável por cerca de 20% da despesa total da produção de etanol 2G (Wang, Kobayashi e Mochidzuki, 2015). Além disso, ocorre também a perda de eficiência enzimática durante a etapa da hidrólise devido à presença de inibidores advindos do pré-tratamento e a adsorção das celulasas sobre a lignina residual, é mais um obstáculo, isso torna necessária a adição de uma quantidade maior enzimas para se alcançar uma eficiência de conversão satisfatória dos polissacarídeos (Florencio *et al.*, 2016).

Algumas estratégias para melhorar o rendimento da hidrólise podem ser utilizadas a fim de diminuir a perda de eficiência enzimática pela adsorção improdutiva das enzimas à lignina residual, como a adição de surfactantes não iônicos (Tween 20 e 80), polímeros (polietilenoglicol – PEG) e proteínas não catalíticas (Soro Albumina Bovina – BSA). Essas substâncias aumentam a conversão de celulose à glicose devido à interação destas com a lignina, em substituição da interação enzima-lignina, e pelo efeito estabilizador que podem exercer sobre as enzimas, permitindo assim a utilização de uma carga enzimática menor e conseqüente diminuição do custo de produção (Wang, Kobayashi, Hiraide, *et al.*, 2015; Wang, Kobayashi e Mochidzuki, 2015; Florencio *et al.*, 2016).

A adição de surfactantes, polímeros e proteínas não catalíticas pode melhorar o rendimento da hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas, porém a inserção destes também envolve gastos adicionais ao processo. Sendo assim, a busca por aditivos alternativos que minimizem a adsorção das enzimas na biomassa se torna imprescindível para tornar o processo economicamente mais viável.

O soro de leite é um coproduto gerado em grandes quantidades nas indústrias de laticínios, rico em sólidos como proteínas, lipídeos, sais e lactose. Devido a sua carga de matéria orgânica e ao fato de que muitas vezes ele é descartado de forma incorreta no meio ambiente pelas pequenas e médias indústrias de laticínio e dificuldades de se implementar tecnologias para seu beneficiamento, é considerado um problema ambiental (Siso, 1996; Guimarães *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2014). A grande disponibilidade de soro de leite, sua rica composição e baixo custo, tornam este coproduto um ótimo substrato para diversas aplicações. Assim, o soro de leite poderia ser uma alternativa de baixo custo para substituir o uso do BSA e surfactantes no bloqueio da lignina presente na biomassa lignocelulósica, reduzindo a adsorção de enzimas.

A fim de diminuir os custos de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica algumas estratégias podem ser usadas, como a produção *on-site* das enzimas hidrolíticas a partir dos extratos brutos de fungos em detrimento ao uso de coquetéis comerciais purificados (Falkoski *et al.*, 2013). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem mostrado o potencial do uso de extratos dos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* como bons produtores de celulasas e hemicelulasas, quando cultivados em resíduos agroindustriais (Visser *et al.*, 2013). Estes autores mostraram ação sinérgica entre os extratos enzimáticos de *C. cubensis* e *P. pinophilum*, principalmente para as atividades de Fpase e endoglicanase, além disso, foi mostrado que as enzimas presentes na mistura *C.cubensis:P.pinophilum* são mais tolerantes a compostos fenólicos, os quais podem levar a inativação enzimática, do que as enzimas provenientes de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* (Ázar *et al.*, 2018) que geralmente compõe os coquetéis comerciais. Esses resultados realçam o grande

potencial de aplicação deste coquetel enzimático na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Desse modo, este trabalho visa compreender o efeito da adição do soro de leite na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor com a utilização da mistura dos extratos de *C. cubensis* e *P. pinophilum*, tendo como interesse a substituição de agentes bloqueadores como o BSA, por uma fonte de proteínas não catalíticas de baixo custo e que seja igualmente eficiente para diminuir as interações não específicas entre as enzimas e a lignina. Dessa forma, esperamos contribuir para tornar a tecnologia de produção de etanol 2G economicamente mais viável.

## 2- Revisão de literatura

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Biomassa lignocelulósica

A produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica é baseada na conversão dos carboidratos presentes na parede celular da planta em açúcares fermentescíveis. A parede celular é caracterizada pela presença de uma gama de polissacarídeos, proteínas estruturais e compostos fenólicos que exercem a função de proteção contra o estresse externo, além de fornecer suporte estrutural e mecânico aos tecidos das plantas (Guerrero *et al.*, 2016). Os polímeros presentes na planta são organizados em estruturas tridimensionais complexas que dependem do tipo botânico e das condições de crescimento entre outros fatores, sendo que a fração celulósica varia entre 35-40%, a hemicelulósica 20-30% e a lignina 10-30% além de uma pequena quantidade de pectina (Jørgensen e Pinelo, 2017).

A celulose é um polímero de glicose unido por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  rotacionadas  $180^\circ$  para formar o dissacarídeo chamado celobiose, essa conformação dos resíduos permite uma forte interação entre as cadeias paralelas de glicose através de interações de Wan der Waals e de hidrogênio, constituindo assim, uma rede extensa de microfibrilas insolúveis que variam entre a forma cristalina e amorfa (Sorek *et al.*, 2014; Isikgor e Becer, 2015; Guerrero *et al.*, 2016).

A hemicelulose é inserida na parede celular com a função de formar uma rede complexa composta pela ligação entre as microfibrilas de celulose e a lignina, fazendo com isso, o fortalecimento da parede celular da planta. Este é um polissacarídeo de grande complexidade, que apresenta muitas ramificações, com um esqueleto composto por uma grande diversidade de pentoses e hexoses, como a xilose, arabinose, manose, glicose, além de ácidos urônicos (glucurônico e galacturônico) unidos por ligações  $\beta(1-4)$ . A sua composição varia muito entre as espécies de planta, entretanto o componente mais abundante da hemicelulose, na maioria dos casos é a xilose (Peng *et al.*, 2012; Kricka *et al.*, 2014; Isikgor e Becer, 2015; Le Floch *et al.*, 2015).

A lignina é um polímero heterogêneo, que ao contrário da celulose e da hemicelulose, não é constituído de carboidratos, mas sim de fenilpropanóides (álcoois aromáticos). A lignina é formada a partir da polimerização (ligações éter e carbono-carbono) dos monômeros de 4-hidroxifenilpropanóides (monolignóis) que são oxidados por peroxidases ou lacases no seu respectivo radical fenólico. As unidades fenólicas monoméricas são denominadas de siringil (S), p-hidroxifenil (H) e guaiacil (G), sendo a quantidade de cada um dependente da espécie de planta e de tecido. Durante o crescimento da planta, os monômeros se infiltram na matriz polissacarídica conferindo resistência mecânica e à degradação química e bioquímica (Sorek *et al.*, 2014; Isikgor e Becer, 2015; Le Floch *et al.*, 2015; Guerriero *et al.*, 2016).

## **2.2. Produção de bioetanol**

A produção de biocombustíveis pode ser dividida em dois seguimentos, os combustíveis de primeira geração, produzidos a partir de açúcares oriundos diretamente do caldo de vegetais (cana-de-açúcar, milho e arroz) e os de segunda geração, que dependem da conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares simples. A biomassa lignocelulósica é a matéria mais abundante da terra, constituída por resíduos agroflorestais, agroindustriais e alimentares, sendo de origens renováveis e produzidas em grandes quantidades, além de apresentarem baixo custo e uma composição rica em polissacarídeos, celulose, hemicelulose e pectina (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015; Schneider *et al.*, 2016).

O Brasil é o líder mundial em produção de cana-de-açúcar. Na safra de 2016/2017 foram produzidos 657,18 milhões de toneladas, sendo produzidos 38,70 milhões de toneladas de açúcar e 26,45 bilhões de litros de etanol de primeira geração (Conab, 2017). Portanto, devido a grande disponibilidade e potencial da biomassa lignocelulósica oriunda da cana-de-açúcar, o uso do bagaço da cana vem se destacando para a produção de etanol 2G.

O processo de produção de etanol de segunda geração é complexo, sendo necessárias três etapas de processamento até a sua destilação: pré-tratamento da biomassa, a hidrólise e a fermentação.

Devido à recalcitrância natural da biomassa, existe uma resistência à hidrólise enzimática, assim o pré-tratamento é utilizado para solubilizar e separar as frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa, da fração de lignina, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando as suas regiões amorfas, o que possibilita maior ação das celulases utilizadas na etapa de hidrólise (Gupta e Verma, 2015; Kim *et al.*, 2015).

O passo crítico da obtenção de etanol 2G é a hidrólise, ou sacarificação, pois é nela que ocorre a conversão dos carboidratos a monômeros de açúcares simples, que serão fermentados à etanol. Essa etapa pode ser realizada de forma enzimática, utilizando-se celulases e hemicelulases, ou de forma química, pelo uso de ácidos fortes. Entretanto a hidrólise enzimática é mais vantajosa devido a sua baixa toxicidade, baixo uso de energia, e por não favorecer a formação de inibidores, além disso, as enzimas apresentam alta especificidade pelo substrato. Mesmo com todas essas vantagens, a hidrólise enzimática é uma etapa complexa, pois exige a presença de uma gama de enzimas capazes de hidrolisar eficientemente a biomassa, além disso, pode ocorrer a adsorção dessas na lignina residual o que acarreta a diminuição do rendimento da etapa (Gupta e Verma, 2015; Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015).

Após a biomassa lignocelulósica ser hidrolisada em pentoses e hexoses, procede-se a etapa de fermentação, na qual um microorganismo (bactéria, levedura ou fungo filamentosos), converte as hexoses (glicose, manose, galactose) à etanol. As pentoses (xilose, arabinose) também podem ser convertidas a etanol, porém com baixo rendimento ou serem convertidas a outros produtos de valor agregado como o xilitol e butanol (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015; Saini *et al.*, 2015).

### **2.3. Gargalos da produção de bioetanol**

A produção de etanol de segunda geração vem ganhando espaço e algumas indústrias já começaram a implementar plantas piloto de produção. Entretanto, mesmo com todo o potencial para a conversão da biomassa em etanol, esse processo para se tornar economicamente viável, ainda precisa superar alguns desafios.

#### **2.3.1. Pré-tratamento**

Um dos gargalos da produção de bioetanol é o uso de uma tecnologia de pré-tratamento eficiente e de baixo custo, que seja capaz de diminuir a cristalinidade da celulose e ao mesmo tempo preservar os açúcares da hemicelulose sem que haja grande formação de produtos inibidores da hidrólise e fermentação, entre outras características (Banerjee *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2015).

O pré-tratamento ácido, diluído ou concentrado, foi o mais utilizado durante algum tempo por trazer a possibilidade de se recuperar grandes quantidades dos açúcares da hemicelulose (sendo eficiente em sua degradação), entretanto este método gera grande quantidade de inibidores que necessitam ser retirados, inserindo assim uma etapa adicional ao processo. Já a tecnologia que utiliza ácidos orgânicos, como ácido fumárico, pode ser muito eficiente para o pré-tratamento da biomassa, gerando menor quantidade de furfural e pode ser feita com alta carga de sólidos, além de necessitar de um reator de menor volume e baixa demanda energética (Banerjee *et al.*, 2010).

O pré-tratamento alcalino é eficiente na remoção da lignina, deixando a celulose e a hemicelulose mais disponíveis, levando a pouca degradação dos açúcares. Porém, é uma metodologia lenta que necessita de neutralização do álcali e da sua recuperação, além de consumir muita água para lavar os sais de sódio ou cálcio que incorporam a biomassa. (Banerjee *et al.*, 2010; Maitan-Alfenas, Visser, Alfenas, *et al.*, 2015)

Além desses tratamentos, existem ainda o pré-tratamento hidrotérmico, pré-tratamento por explosão a vapor e expansão de fibra de amônia (AFEX). Estes dois últimos têm o mesmo princípio, o qual uma pressão muito alta é exercida sobre o material lignocelulósico seguido de uma rápida descompressão, o que leva a uma

expansão da biomassa, hidrólise de grupos acetil e despolimerização da celulose. Os tratamentos por explosão a vapor, AFEX e hidrotérmico, são tidos como tratamentos mais brandos, pois não removem significativamente a lignina da biomassa (Banerjee *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2016).

### 2.3.2. Enzimas hidrolíticas

O processo de hidrólise enzimática é tido como fator de maior custo na produção de bioetanol devido ao alto preço das enzimas e suas perdas de atividade. Tais limitações ocorrem devido à inibição pelos produtos glicose e celobiose, ligação improdutiva das celobiohidrolases nas cadeias de celulose; desnaturação ou perda de atividade enzimática devido ao agito mecânico, atividade proteolítica ou baixa estabilidade térmica; impedimento físico devido a associações entre a hemicelulose e a lignina, além da interação inespecífica das enzimas com a lignina (Kristensen *et al.*, 2007; Jørgensen; Kristensen e Felby, 2007).

Devido a grande complexidade estrutural da biomassa lignocelulósica, é necessária a atuação de um conjunto diversificado de enzimas para a hidrólise completa deste substrato (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015). A hidrólise do polímero de celulose é dependente das endoglicanases (EC. 3.2.1.4) que atuam na região amorfa da celulose, hidrolisando randomicamente as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 internas, originando extremidades livres, das celobiohidrolases (EC 3.2.1.176) que clivam as unidades de celobiose na região cristalina da celulose a partir das extremidades redutoras ou não redutoras, as exoglicohidrolases (EC 3.2.1.74) são responsáveis por remover os resíduos de glicose das extremidades não redutoras, além disso, é necessária também a atuação das  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose em glicose e removem unidades de glicose de extremidades não redutoras de ciclodextrinas pequenas (Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015; Saini *et al.*, 2015) .

Para a hidrólise da hemicelulose é necessária uma gama ainda maior de enzimas devido a sua grande complexidade estrutural. A hidrólise completa da xilana, principal constituinte da hemicelulose, requer a ação das endo- $\beta$ -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) que

atuam de forma aleatória nas ligações internas liberando xilo-oligossacarídeos,  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37) que hidrolisa as extremidades não redutoras das cadeias de xilana liberando xilose, além de várias enzimas acessórias como as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glicuronidase (EC 3.2.1.139) e  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) (Glass *et al.*, 2013).

Recentemente foram descobertas enzimas auxiliares que modificam a lignina, elas são peroxidases e oxidases, as quais incluem as ligninas peroxidases (Lip), manganês peroxidases (MnP), peroxidases versáteis (VP), lacases e peroxidases de descoloração de corantes (DyP). Essas enzimas promovem a formação de radicais livres altamente reativos e não específicos (radicais arila e fenóxi), promovendo reações degradativas na lignina (Abdel-Hamid *et al.*, 2013). Ainda, se destacam as Monooxigenases Líticas de Polissacarídeos (LPMOs), que catalisam a clivagem oxidativa de ligações glicosídicas na superfície da celulose, de modo a aumentar a acessibilidade do substrato para as enzimas hidrolíticas (Vu e Marletta, 2016).

### 2.3.3. Produção das enzimas

Um dos maiores problemas para a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrólise enzimática é justamente o custo dessas enzimas para o processo. Com a finalidade de diminuir os custos, pode-se adotar a prática de produção *on-site* das enzimas, que consiste na fabricação do coquetel enzimático no próprio laboratório através do cultivo de fungos que apresentam potencial de hidrólise de biomassa, como os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, e utilização do seu extrato bruto para aplicação na hidrólise (Falkoski *et al.*, 2013). Além disso, para a obtenção de um coquetel enzimático mais completo e eficiente, pode-se realizar a complementação deste com outro extrato bruto, ou com enzimas acessórias específicas, esta mistura enzimática pode levar a uma ação sinérgica das enzimas e com isso aumentar a eficiência de hidrólise (Visser *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa reportou o potencial dos fungos *Chrysosporthe cubensis* e *Penicillium pinophilum* como bons produtores de celulasas e hemicelulasas. O fungo fitopatogênico *C. cubensis*, é um patógeno de espécies arbóreas subtropicais, conhecido

por causar grandes danos em plantações de eucalipto, devido ao aparecimento de lesões profundas na planta, conhecidas como câncer, levando a perda de qualidade da madeira e de produtividade (Guimarães, *et al.*, 2010). No estudo realizado por Falkoski *et al.* (2013), o fungo *C. cubensis* quando cultivado em farelo de trigo, produziu grandes quantidades de endoglicanase,  $\beta$ -glicosidade, xilanase e celulasas totais (FPase), apresentando potencial para aplicação nos processos de sacarificação de biomassa.

O fungo *P. pinophilum* é de origem saprófita e conhecido por sua capacidade de mineralizar fosfato e utilizá-los como fonte de fósforo promovendo o controle biológico de doenças em plantas (Maity *et al.*, 2014). Além disso, este fungo tem sido estudado como uma fonte produtora de enzimas que atuam na hidrólise da matéria lignocelulósica. Wood *et al.* (1989) após a realização de processos de purificação, conseguiram isolar dois tipos de celobiohidrolase e cinco tipos de endoglicanase do seu extrato.

Visser *et al.* (2013) mostram em seu estudo uma ação sinérgica entre os extratos enzimáticos de *C. cubensis:P. pinophilum*, principalmente para FPase e endoglicanase, sendo que a mistura 50:50 (v/v) foi considerada eficiente para hidrólise, utilizando-se um pré-tratamento alcalino brando, baixa carga enzimática ( 8 FPU/g) e alta carga de sólidos (10,12 e 20% p/v). Além disso, no estudo realizado por Ázar *et al.* (2018), foi mostrado que as enzimas presentes na mistura *C. cubensis:P. pinophilum* são mais tolerantes a compostos fenólicos (que podem levar a inativação enzimática) do que as enzimas provenientes de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. Esses resultados realçam o grande potencial de aplicação deste coquetel enzimático na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

#### **2.3.4. Adsorção das enzimas na lignina e bloqueio**

A lignina desempenha um papel limitante na hidrólise enzimática da celulose, pois atua como barreira física dificultando o acesso das enzimas à celulose ou também, se ligando improdutivamente às celulasas, tornando-as indisponíveis para catálise hidrolítica da celulose. A limitação da hidrólise pela presença da lignina tornou-se um fator importante na fabricação de etanol 2G, pois a hidrólise da celulose em escala

industrial é preferencialmente realizada com baixa carga enzimática, e nessa condição a ligação improdutiva da lignina ocorre de forma pronunciada (Siqueira *et al.*, 2017).

Durante o pré-tratamento, a estrutura lignocelulósica é desconstruída, e a lignina sofre modificações estruturais originando porções menores de lignina e moléculas derivadas (compostos fenólicos e ácidos) que são liberadas no licor de pré-tratamento. Estas substâncias, juntamente com a lignina residual presente na fração sólida da biomassa interferem no desempenho das enzimas durante a sacarificação, pois agem como uma barreira física na superfície da celulose, os compostos fenólicos agem diretamente sobre as celulasas e também pode ocorrer a ligação improdutiva da lignina residual com as enzimas, sendo este último fator considerado como a principal razão da perda de atividade das celulasas (Rahikainen *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016).

A perda de atividade das celulasas devido à ligação inespecífica com a lignina pode ocorrer através de três tipos de interações: eletrostáticas (dependente do pH do meio reacional e consequente interação entre a carga superficial das enzimas com a superfície da lignina), interações de hidrogênio (maiores responsáveis pela interação das celulasas com os compostos fenólicos) e interações hidrofóbicas que ocorrem com maior frequência, e são responsáveis pela adsorção das enzimas à lignina, majoritariamente através de seus domínios CBD (Liu *et al.*, 2016).

Para facilitar a interação entre as celulasas e a superfície da celulose, essas enzimas apresentam um domínio de ligação a carboidratos (CBM), específico para interações com a celulose, conhecido como CBD (Saini *et al.*, 2015). Esse domínio de ligação pode agir aumentando a concentração das celulasas sobre a superfície da celulose, aumentando a seletividade das enzimas e a sua processividade (a enzima não se desprende do substrato após a clivagem da ligação glicosídica) (Gomes *et al.*, 2015).

Entretanto o domínio CBD ao mesmo tempo em que atua de forma a facilitar a interação das enzimas com a celulose, contribui para a interação não produtiva dessas com a lignina, devido à presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como os resíduos aromáticos de tirosina e triptofano em sua superfície, que interagem com resíduos hidrofóbicos na superfície da lignina (Jørgensen e Pinelo, 2017).

Além disso, a lignina possui maior caráter hidrofóbico que a celulose e consequentemente a hidrofobicidade da biomassa lignocelulósica é aumentada de acordo com o conteúdo de lignina presente e dessa forma as interações com a lignina podem ser favorecidas (Hodgson e Berg, 2007; Saini *et al.*, 2016). De acordo com Ko *et al.*, (2015) o maior conteúdo de lignina na biomassa facilita a adsorção de enzimas, e a composição desta também interfere de modo significativo na adsorção enzimática. Ligninas com maior conteúdo de guaiacil são capazes de adsorver mais enzimas do que ligninas com menor conteúdo do mesmo.

Devido aos problemas provenientes da presença da lignina no meio reacional, algumas estratégias são utilizadas para diminuir a perda de atividade enzimática como a modificação genética da planta, a fim de diminuir o conteúdo ou a composição da lignina (Bonawitz *et al.*, 2014), a engenharia das enzimas de forma que estas interajam mais fracamente com a lignina, pois a remoção do domínio CBM geralmente reduz a afinidade pela lignina, a remoção da lignina após o pré-tratamento utilizando por exemplo o peróxido de hidrogênio e lacases, e por último estratégias de bloqueio dos sítios de interação da lignina utilizando-se surfactantes ou proteínas não-catalíticas, como a soro albumina bovina (BSA), pois essas moléculas são capazes de interagirem com a lignina em substituição a ligação enzima-lignina, permitindo assim, que as enzimas fiquem livres para interagir com seus substratos (Kristensen *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).

Muitos estudos vêm demonstrando a eficiência do uso de agentes bloqueadores no aumento do rendimento de hidrólise. Seo *et al.* (2011) mostraram que a adição de Tween 20 aumentou a conversão de glicose de 9 para 21% para a biomassa com alto teor de lignina e de 1 para 8,5% para a biomassa com baixo teor de lignina. Kristensen *et al.*, (2007) também observaram que o uso de surfactantes sobre a palha de arroz tratada com ácido sulfúrico aumentou a conversão de celulose em mais de 60%. Wang, Kobayashi e Hiraide (2015) concluíram que na presença de BSA, a hidrólise do papel de filtro aumentou. Além disso, eles também relataram que o BSA aumentou a estabilidade das enzimas e a conversão de xilana. Apesar desse aumento na conversão de glicose, esses agentes bloqueadores não possuem custos atrativos, por isso se faz

necessário encontrar outros agentes que possuam um melhor custo-benefício para o processo. Como potenciais substitutos temos a proteína de soja, proteína do leite, farinha de milho e também as expansinas bacterianas, enzimas que se ligam preferencialmente à lignina (Saini *et al.*, 2016).

## 2.5. Soro de Leite

O soro de leite é proveniente da coagulação da caseína no preparo de queijos, sendo um coproduto gerado em grandes quantidades nas indústrias de laticínios, apresentando em sua composição sólidos como proteínas (0,6-0,8% p/v), lipídeos (0,4-0,5% p/v), lactose (4,5-5% p/v) e sais (8-10% peso seco). Entretanto é considerado um problema ambiental, pois apresenta grande carga de matéria orgânica e muitas vezes é descartado de forma incorreta no meio ambiente, como em cursos d'água e no solo. (Siso, 1996; Guimarães *et al.*, 2010)

A composição proteica do soro de leite pode ser dividida em frações, compostas por  $\beta$ -lactoglobulina (BLG),  $\alpha$ -lactoalbumina (ALA), soro albumina bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP), além de lactoferrina,  $\beta$ -microglobulinas,  $\gamma$ -globulinas, lactoperoxidase e lisozima. A  $\beta$ -lactoalbumina é a maior proteína do soro, apresentando grande conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada, seguida pela  $\alpha$ -lactoalbumina que possui grande teor de triptofano (6%), além de ser rica em lisina, leucina, treonina e cistina. A maioria das proteínas que compõe o soro de leite são globulares com elevada hidrofobicidade e isto contribui para a interação dessas com os sítios de ligação da lignina, tornando o soro de leite um potencial agente bloqueador da lignina (Phadungath, 2005; Haraguchi *et al.*, 2006; De Almeida *et al.*, 2013).

A grande disponibilidade de soro de leite, sua rica composição e baixo custo, tornam este coproduto um ótimo substrato para diversas aplicações, produção de bioetanol, biogás, polissacarídeos (ex. goma xantana), produção de enzimas entre outros produtos (Guimarães *et al.*, 2010).

## 2.6. Custo de agentes bloqueadores comerciais x Custo do soro de leite

O custo de surfactantes e do BSA são fatores limitantes para o seu uso como bloqueadores da lignina:

Tabela 1: Preço dos agentes bloqueadores

<b>Agente</b>	<b>Preço (R\$)</b>
<b>Tween 80</b>	214 (100 mL)
<b>Tween 20</b>	129 (100 mL)
<b>Polietilenoglicol 6000</b>	571 (1 kg)
<b>BSA</b>	1.707 (100g)
<b>Soro de leite em pó industrial</b>	120 (25 kg)
<b>100% Pure Whey Protein</b>	150 (900 g)

Além do soro de leite poder ser adquirido facilmente no comércio, ele pode ser obtido diretamente das indústrias de laticínios e assim baratear ainda mais o seu custo, além de contribuir para minimização dos impactos ambientais do seu descarte incorreto.

Por apresentar um conteúdo relevante de aminoácidos aromáticos, como o triptofano e uma gama de proteínas que podem interagir de forma mais eficiente com a lignina, permitindo que as (hemi) celulasas fiquem mais livres para proceder à hidrólise da biomassa e também por seu baixo custo, o soro de leite obtido a partir da produção de queijo Mozarela foi usado neste experimento como possível agente bloqueador da lignina.

## 3- Objetivos

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do soro de leite como agente bloqueador da lignina na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, para aumentar o rendimento de açúcares e minimizar a adsorção inespecífica das enzimas sobre a biomassa.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de proteínas não catalíticas no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor;
- Estudar os efeitos da adição de proteínas não catalíticas na eficiência da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a mistura enzimática produzida por *C. cubensis* e *P. pinophilum*
- Avaliar o efeito das proteínas não catalíticas na termoestabilidade das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

## 4- Materiais e Métodos

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento experimental**

#### **4.1.1. Bloqueio da Lignina**

O BSA nas concentrações de 90 e 107 mg proteína/g de lignina foi pré-incubado com o bagaço de cana-de-açúcar (5% m/v) em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5) contendo azida de sódio e tetraciclina, afim de evitar contaminações, durante 1h a 50°C e 250 rpm. Em seguida foi adicionada a mistura enzimática (2,5 FPU/g bagaço) procedendo à incubação do meio reacional durante 72h.

Foi realizado também, testes com os mesmos tratamentos sem a etapa de pré-incubação, ou seja, o extrato enzimático foi adicionado juntamente com as proteínas não catalíticas, seguido da incubação do meio reacional em shaker rotatório a 250 rpm e 50°C, durante 72h para a realização da hidrólise do bagaço de cana.

Ao final do período de incubação (72 h), o sobrenadante da reação foi coletado e submetido à centrifugação a 113 xg durante 5 minutos, as concentrações de glicose e xilose do sobrenadante foram determinadas por HPLC e a atividade enzimática foi determinada de acordo com os ensaios apropriados.

A partir do melhor resultado de rendimento de hidrólise obtido para o BSA, o procedimento de bloqueio da lignina foi realizado na presença do soro de leite possuindo uma concentração de proteínas equivalente à concentração de BSA previamente estabelecida.

#### **4.1.2. Bloqueio da lignina pelo soro de leite**

Os experimentos para bloqueio da lignina, utilizando soro de leite como proteína não catalítica foram realizados em frascos Erlenmeyers de 25 mL com 10 mL de volume de trabalho. Os experimentos foram realizados como descrito no item 4.1.1, para a proteína não catalítica BSA, com a concentração proteica final estabelecida em

107,0 mg proteína/ g de lignina. Os frascos foram mantidos sob agitação em shaker orbital a 250 rpm, a 50° C por 72 h. Após este período, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para avaliação do perfil de proteínas e enzimas livres e também para quantificação de glicose e xilose liberadas. As concentrações das proteínas e enzimas livres foram calculadas subtraindo a quantidade de proteína e enzima inicialmente adicionada da quantidade total encontrada no sobrenadante após as 72 h de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.3. Termoestabilidade**

A estabilidade térmica das enzimas presentes na mistura enzimática foi testada na temperatura de 50° C. O extrato enzimático foi incubado em banho-maria, com tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5, juntamente com as proteína não-catalítica (BSA, soro de leite *in natura* e soro de leite precipitado) na concentração de 107mg/ g de lignina, durante 72 h. Alíquotas ao longo do tempo foram retiradas e as atividades enzimáticas relativas foram conduzidas de acordo com seu ensaio enzimático específico, como será descrito nos métodos analíticos, item 4.3.2. Foi realizado também, um experimento controle, no qual o extrato enzimático foi incubado na ausência de proteínas não catalíticas.

### **4.2. Matérias-primas e reagentes**

#### **4.2.1. Reagentes**

Os reagentes xilose, glicose, xilana Beechwood,  $\rho$ -nitrofenol ( $\rho$ NP),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Xyl),  $\rho$ -Nitrofenil- $\beta$ -D-cebiosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Cel), carboximetilcelulose (CMC), e também os reagentes fosfato de monopotássio, nitrato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de cobre, acetato de sódio, carbonato de sódio, ácido dinitrossalicílico (DNS), Batata dextrose ágar (BDA) e Comassie Blue G-250 foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). O extrato de

levedura foi obtido de Himedia Laboratories Co. (Mumbai, Maharashtra, India). Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentam procedência e grau de pureza.

#### **4.2.2. Bagaço: Obtenção e pré-tratamento**

O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Professora Doutora Adriane Milagres do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (USP).

O pré- tratamento utilizado foi o explosão à vapor, no qual o bagaço de cana-de-açúcar (50% de umidade) foi alimentado em um reator sistema contínuo em escala piloto, com tempo de residência de 15 min, sendo injetado vapor saturado no reator a 15 bar com vazão de 25-30 kg.h<sup>-1</sup> a 190 °C de acordo com o descrito por Rocha *et al.* (2012). O bagaço foi descarregado e centrifugado para que a fração líquida fosse totalmente removida.

#### **4.2.3. Produção dos extratos enzimáticos**

O fungo *Chrysosporthe cubensis* foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (Falkoski *et al.*, 2013). O fungo *Penicillium pinophilum* foi isolado de resíduos em uma unidade de produção de gados em Minas Gerais em um estudo de bioprospecção de fungos produtores de celulases e mantido na coleção micológica do Laboratório de Análises Bioquímicas da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Ambos os fungos foram mantidos em placas de BDA (batata dextrose ágar) a 28° C e repicados periodicamente.

O pré-inóculo do fungo *C. cubensis* foi preparado a partir do seu crescimento sob fermentação submersa em frascos de Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio com a seguinte composição: glicose 10,0 g.L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 2,0 g.L<sup>-1</sup>. Cada frasco foi autoclavado a 120° C por 20 min e posteriormente, inoculado com 10 discos de ágar cortados a partir

de 10 dias de crescimento de *C. cubensis* em meio BDA e incubado em shaker rotatório por 7 dias, a 28° C e 150 rpm.

Para a produção do extrato enzimático via fermentação em estado semissólido, foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 12,5 g de farelo de trigo e 18,75 mL de meio de cultura (mistura final de 60%), contendo:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$  0,5  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,25  $\text{g.L}^{-1}$  e extrato de levedura 2,0  $\text{g.L}^{-1}$  e os elementos traço:  $\text{MnCl}_2$  0,1  $\text{mg.L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,075  $\text{mg.L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,02  $\text{mg.L}^{-1}$ ;  $\text{FeCl}_3$  1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  e  $\text{ZnSO}_4$  3,5  $\text{mg.L}^{-1}$ . O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min e então inoculado com 10 mL do pré-inóculo. Os frascos foram mantidos a uma temperatura controlada de 28°C, durante 10 dias.

Como descrito por Visser *et al.* (2013), o fungo *P. pinophilum* foi cultivado sob fermentação submersa em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 125 ml meio de cultura 1,0  $\text{g.L}^{-1}\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,5  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ; 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  extrato de levedura; 0,5  $\text{g.L}^{-1}$  peptona; 0,2  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ; 0,03  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2$ ; 0,025  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$  e 0,04  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ , sendo o capim-elefante (3% m/v) a fonte de carbono. Os frascos foram autoclavados a 120° C por 20 min e posteriormente, inoculado com 9 discos de ágar cortados a partir de 7 dias de crescimento de *P. pinophilum* em meio PDA e incubado em shaker rotatório por 7 dias, a 28° C e 150 rpm.

As enzimas secretadas pelo *C. cubensis* foram extraídas com tampão acetato de sódio, 50 mM pH 5, na proporção de 10:1 (tampão/massa de substrato seco), durante agitação a 150 rpm por 60 min em temperatura ambiente. Para a obtenção do extrato enzimático de ambos os fungos, os sólidos foram separados por filtração em membrana de nylon, seguido de centrifugação a 15.000 x g por 10 min. A mistura 50:50 (v/v) dos extratos enzimáticos foi liofilizada e concentrada 10 vezes por ressuspensão em volume apropriado de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.

#### 4.2.4. Soro de leite: Obtenção e precipitação de proteínas

Para aplicação como fonte proteica não catalítica, o soro de leite foi utilizado de duas formas: *in natura* e precipitado com etanol gelado.

O soro de leite foi obtido dos Laticínios Viçosa pertencente à Universidade Federal de Viçosa, a partir do processo de produção do queijo Mozzarella. 300 mL de soro foram liofilizados para retirada de água e após a secagem foram ressuspensos em 30 mL de tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5,0, assim a solução denominada “soro de leite *in natura*” foi concentrada 10x em relação a solução inicial.

Como o soro de leite é um material de coloração turva (branco) e possui muitas partículas em suspensão, para se proceder à quantificação de proteínas presentes nele, é necessário que seja feita uma precipitação dessas proteínas, visto que essas características interfeririam no método de quantificação utilizado (Bradford). Neste trabalho optamos pela precipitação com etanol gelado (10:1 v/v) durante 30 minutos de acordo com o descrito Jin *et al.* (2016) (adaptado), seguida pela ressuspensão das proteínas em água destilada ou tampão, devido ao fato de a precipitação com etanol, ser uma metodologia rápida e eficiente.

Admitindo-se que a precipitação e ressuspensão das proteínas contidas no soro foram eficientes, a concentração de proteínas presentes no soro de leite *in natura*, era a mesma da solução precipitada e a partir disso determinamos a concentração proteica do soro de leite e procedemos aos experimentos com ele.

A fim de se verificar a influência da adição apenas das proteínas do soro, sem a interferência dos seus demais componentes, avaliamos a ação do soro de leite precipitado sobre a lignina. Para obtenção do soro de leite precipitado, realizamos o mesmo procedimento descrito anteriormente de acordo com a metodologia de Jin *et al.* (2016) (adaptado), ressuspendendo em seguida, a solução de proteínas precipitadas em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5, em volume igual ao da solução de soro de leite *in natura* que foi submetido à precipitação (aproximadamente 50 mL de volume

inicial e 50 mL ressuspensos), para garantir que a concentração de proteínas presente na solução ressuspensa fosse a mesma do soro completo.

### 4.3. Métodos analíticos

#### 4.3.1. Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Para realização da composição do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, procedeu-se a quantificação do teor de lignina da amostra foi utilizado o método de Klason (modificado), segundo a Norma TAPPI T222 om-02. Pesou-se 0,7133 g (base seca) de bagaço de cana-de-açúcar previamente moído (40-60 mesh) e transferiu-se para um tubo autoclavável de 500 mL contendo 10,7 mL de solução de ácido sulfúrico 72% v/v ( $d = 1,6338 \text{ g.mL}^{-1}$ ). A mistura bagaço/ácido permaneceu sobre agitação em chapa magnética por um período de 2 h. Posteriormente, as amostras foram dessecadas até peso constante. Nesta etapa, considerou-se que toda a matéria orgânica insolúvel era lignina. O teor de lignina insolúvel foi determinado gravimetricamente.

Para determinação da lignina solúvel e dos açúcares utilizou-se o filtrado obtido durante a determinação da lignina insolúvel, anteriormente descrito. A quantificação da lignina solúvel foi feita através da medida de absorvância em 215 nm e 280 nm seguindo metodologia adaptada por Marabezi (2009). A concentração de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) presentes no hidrolisado foi utilizada para estimar os conteúdos de celulose e hemicelulose nos bagaços pré-tratados. Os coeficientes utilizados para converter açúcares em celulose e hemicelulose foram os relatados por Gurgel *et al* (2014). Para determinação da concentração dos açúcares foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu, equipado com um detector de índice de refração (Shimadzu RID-6A) e uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad de 300 x 7,8 mm) mantida a 45 °C. As condições cromatográficas utilizadas para separar os analitos envolveram o uso de ácido sulfúrico ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) como eluente em um fluxo de  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ .

### **4.3.2. Avaliação da atividade enzimática**

As atividades de FPase e endoglicanase foram determinadas usando papel de filtro Whatman No.1 (1x6 cm, 50 mg) e CMC de 1,25% (m/v) como substratos, respectivamente, de acordo com as condições padrão descritas anteriormente (Ghose, 1987). A atividade de xilanase foi determinada usando xilana Beechwood como substrato (1% m/v). Os açúcares redutores totais liberados durante os ensaios enzimáticos foram quantificados pelo método de Miller (1959), com o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) usando glicose ou xilose como padrão. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, em tampão de acetato de sódio, 100 mM, pH 5, a 50°C. As reações foram conduzidas por 30 ou 60 min e continham 100 µL da solução de enzima adequadamente diluída e 400 ou 200 µL da solução de substrato de polissacarídeo preparada em tampão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol do produto correspondente (equivalente de glicose ou xilose) por minuto, nas condições utilizadas no ensaio.

#### **4.3.2.1. Ensaios de pNP**

Atividades de β-glicosidase, β-galactosidase, β-xilosidase e celobihidrolase foram determinadas usando p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pNP-β-Glc), p-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (pNP-β-Gal), p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo (pNP-β-Xil) e p-Nitrofenil-β-D-celulobiosídeo (pNP-β-Cel) como substratos, respectivamente. A mistura reacional foi composta de 50 µL de solução do substrato sintético (concentração final 1 mM), 20 µL de solução enzimática apropriadamente diluída, e 30 µL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5. A reação foi incubada em placa de Elisa por 15 min a 50 °C e paralisada pela adição de 100 µL de solução carbonato de sódio 0,5 M. Absorbância foi medida a 410 nm e o conteúdo de p-nitrofenol liberado foi estimado por uma curva padrão previamente construída. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio utilizadas.

#### **4.3.3. Determinação da concentração de proteínas**

O método descrito por Bradford (1976) com modificações foi utilizado para a determinação das concentrações proteicas nas preparações enzimáticas e nas soluções das proteínas não catalíticas. O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em papel de filtro. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250.

A concentração proteica das amostras foi determinada a partir da mistura do extrato proteico precipitado com etanol gelado em banho de gelo por 30 min e centrifugado a 113 xg, por 13 minutos (Jin *et al.*, 2016), ressuspensão e devidamente diluído em 800 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford. A mistura reacional foi agitada em vórtex e mantida por 15 min a temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram tomados a 595 nm e convertidos em concentração de proteínas utilizando uma curva padrão construída com BSA.

#### **4.3.4. Análise da concentração de açúcares por HPLC**

A determinação da concentração de glicose e xilose foi realizada no tempo zero e ao final das 72 horas de sacarificação, no Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-10AD-Shimadzu, com detector RID-6A Shimadzu e coluna Carbohydrate Analysis Column Aminex® HPX-87P Column- 300 mm x 7,8 mm. A água foi utilizada como fase móvel sendo conduzida a um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e a temperatura de 70° C. Os resultados foram calculados pela média dos valores das triplicatas das amostras. O tempo de retenção da glicose e da xilose e suas concentrações foram estimados a partir de uma curva-padrão com soluções padrão de glicose e de xilose.

## 5- Resultados e Discussão

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Enzimas hidrolíticas presentes no blend *Chrysophorthe cubensis*: *Penicillium pinophilum*

O extrato enzimático concentrado, produzido a partir dos extratos de *C. cubensis*:*P. pinophilum* 50:50 (v/v), apresentou concentração de proteínas de 0,111 mg.mL<sup>-1</sup>. As atividades enzimáticas determinadas neste extrato estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividades enzimáticas presentes no extrato enzimático concentrado de *C. cubensis*: *P. pinophilum*.

Atividades	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
FPase	4,7 ± 0,05	42,34± 0,9
Endoglucanase	2,53± 0,03	22,79± 0,01
β-glicosidase	0,74 ± 0,011	6,66± 0,2
Celobiohidrolase	0,073± 0,01	0,66± 0,04
Xilanase	4,54± 0,06	40,9± 0,8
β-xilosidase	0,04± 0,004	0,36± 0,02

O fungo *C. cubensis* apresenta a capacidade de secretar enzimas de degradação da parede celular, especialmente enzimas hemicelulolíticas como as xilanases, sendo essa característica relatada por outros autores (Falkoski *et al.*, 2013; Maitan-Alfenas, Visser e Guimarães, 2015). O extrato do fungo *P. pinophilum*, como reportado por Visser *et al.* (2013), apresenta grande atividade de celulases totais (FPase) e endoglicanase quando cultivado sob fermentação submersa, sendo a mistura entre seus extratos brutos muito interessante. Visser, *et. al* (2013) mostraram que a mistura 50:50 (v/v) destes extratos apresentou sinergismo em relação as atividades de FPase, endoglicanase e xilanase e foi eficiente para a hidrólise da biomassa lignocelulósica.

Como mostrado na Tabela 1, o *blend* entre esses extratos possui uma gama de enzimas que exercem um papel importante na sacarificação da biomassa, como a endoglicanase, que atua sobre as ligações glicosídicas da celulose, gerando oligossacarídeos diversos que poderão servir como substratos para a ação de outras celulasas. Além disso, o extrato apresenta atividade considerável de xilanase (4,54 U/mL), enzima que é fundamental para a completa hidrólise da biomassa lignocelulósica, pois age de forma a aumentar a acessibilidade à celulose atuando nas ligações internas da xilana, dessa forma auxiliam na remoção das fibras de hemicelulose. Sua ação possivelmente ocorre de forma sinérgica com as celulasas, aumentando assim o rendimento de hidrólise da biomassa (Visser *et al.*, 2013; Maitan-Alfnas, Visser e Guimarães, 2015).

## 5.2. Composição do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi cedido e pré-tratado pela professora Adriane Milagres, lotada no Departamento de Biotecnologia da USP de Lorena. O pré-tratamento foi realizado de acordo com a metodologia de explosão a vapor descrito por Rocha *et al.* (2012). A composição química da biomassa antes e após o pré-tratamento está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2:** Análise composicional dos bagaços de cana *in natura* e pré-tratado. As concentrações relativas de lignina, celulose e hemicelulose foram baseadas no peso seco.

Componente	Composição (%)	
	<i>In natura</i>	Pré-tratado
Celulose	36,7± 0,3	52,7 ± 0,3
Hemicelulose	20,5 ±0,1	4,7 ±0,0
Lignina	24,4±0,0	20,9 ± 0,1
Extrativos	4,8 ±0,0	12,2 ± 0,2
Cinzas	6,4 ±0,3	8,8 ± 0,3

O pré-tratamento por explosão a vapor atua de forma química e física na estrutura da biomassa, por meio do contato da biomassa com vapor saturado à alta pressão por determinado tempo (2-30 min) na presença ou ausência de um catalisador ácido, seguida de descompressão rápida até a condição atmosférica (explosão). Dessa forma, as ligações químicas são quebradas fazendo com que o material seja reduzido a partículas menores, diminuindo a resistência à sacarificação (Pitarelo *et al.*, 2012). Este tipo de pré-tratamento é conhecido por diminuir a composição de hemicelulose da biomassa devido à hidrólise dos grupos acetila e por causar transformações na estrutura da lignina, além de alterar a cristalinidade da celulose, o que facilita o acesso das enzimas à celulose na etapa de sacarificação (Menon e Rao, 2012).

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar removeu uma quantidade considerável de hemicelulose, o que torna mais eficiente o acesso das enzimas à celulose, corroborando com o encontrado na literatura (Pitarelo *et al.*, 2012). Conseqüentemente, a concentração relativa de celulose aumentou após o pré-tratamento. Este tipo de pré-tratamento altera a organização estrutural da celulose e conseqüentemente sua área superficial, o que é interessante para o processo de sacarificação, pois a torna mais suscetível ao processo de hidrólise aumentando o rendimento de sacarificação (Santos *et. al* 2012)

A concentração relativa de lignina presente na biomassa pré-tratada em relação ao bagaço *in natura* foi bem próxima. Devido às reações químicas que acontecem durante o processo de autohidrólise do bagaço de cana no decorrer da etapa de pré-tratamento por explosão a vapor, a estrutura da lignina é modificada tornando-se mais recalcitrante e menos reativa que a lignina do bagaço *in natura*, e mesmo que não tenha havido uma redução considerável do conteúdo de lignina, o pré-tratamento proporciona um material com menor densidade de fibras o que contribui para a melhoria do acesso das enzimas hidrolíticas e conseqüentemente da hidrólise da biomassa.

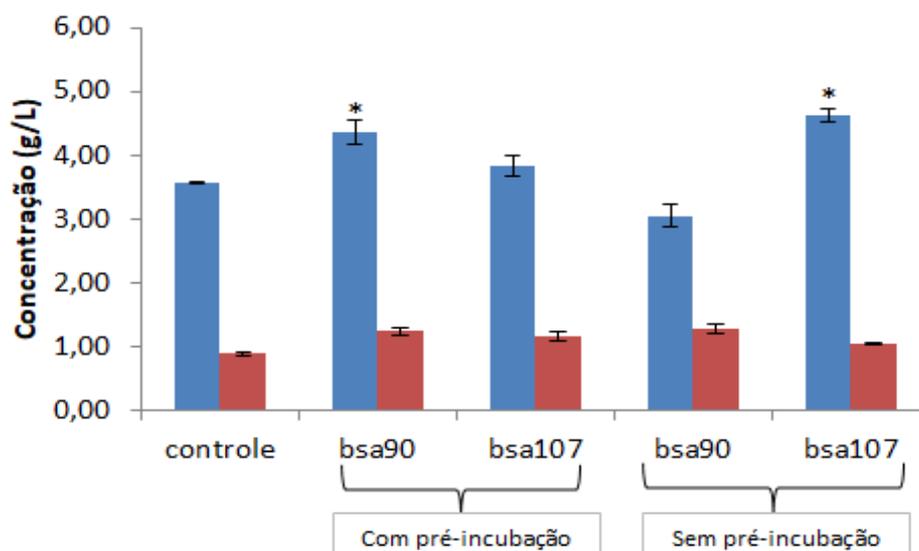
### **5.3. Bloqueio da lignina pela proteína não catalítica BSA**

O método de explosão a vapor foi escolhido como metodologia de pré-tratamento para este estudo devido à sua grande utilização em escala industrial, aproximando assim as condições utilizadas no experimento com as condições usadas nas plantas de produção de etanol 2G, além de ser um pré-tratamento eficiente para remoção da hemicelulose e na promoção de alterações da lignina, melhorando assim o rendimento da hidrólise enzimática.

O tratamento para o bloqueio da lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar foi realizado com e sem pré-incubação com o BSA nas concentrações de 90 e 107 mg de BSA/ g lignina. Essas concentrações de BSA foram estabelecidas a partir do estudo de Florencio et al. (2016), no qual foi utilizada a concentração de 120 mg de proteína de soja/g de lignina, a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Nessa concentração os autores obtiveram melhora no rendimento de açúcares gerados ao final da hidrólise. Com isso, estabelecemos neste trabalho, duas concentrações: uma abaixo do utilizado no estudo, 100 mg de proteína/g de lignina e a concentração de 120 mg de proteína/g de lignina.

Dessa forma, a solução de BSA foi preparada em concentração m/v, a partir da pesagem desse composto, utilizando-se BSA em pó. Entretanto a concentração de proteínas presentes no soro de leite só poderia ser mensurada por um método colorimétrico. Assim, para garantir a igualdade das concentrações entre os tratamentos, realizamos a quantificação de proteínas da solução de BSA e do soro de leite pela metodologia de Bradford. As concentrações calculadas inicialmente, a partir da pesagem do BSA, que deveriam ser de 100 e 120 mg de BSA/ g de lignina, foram equivalentes as concentrações de 90 e 107 mg proteína/ g de lignina, respectivamente, quando determinada pelo método de Bradford. Esta diferença pode ser devido ao grau de pureza do reagente, ou a possíveis erros de preparo da solução.

O passo de pré-incubação consistiu no tratamento da biomassa com BSA durante 1 hora a 50° C, sob agitação horizontal, antes da adição do coquetel enzimático. Esse tratamento foi realizado a fim de se obter um possível equilíbrio de interação entre BSA e lignina e o bloqueio completo desta.



**Figura 1:** Sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na presença da proteína não catalítica BSA. Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de glicose (■) e xilose (■) geradas após 72h de hidrólise do bagaço de cana na presença de BSA nas concentrações de 90 e 107 mg de proteína/g de lignina, com a realização da pré-incubação (1 h, 250 rpm, 50° C) e sem a pré-incubação (SI).

Trabalhos como o de Brethauer *et al.* (2011) relataram um efeito positivo da adição de BSA no passo de pré-incubação aumentando o rendimento de açúcares com o tempo de hidrólise. Já no estudo de Florencio *et al.* (2016), a adição de proteína de soja no passo de pré-incubação diminuiu ligeiramente a liberação de glicose obtida durante a hidrólise enzimática, em comparação com a sacarificação sem pré-incubação, na qual o substrato, coquetel enzimático e proteína de soja foram adicionados simultaneamente no início do processo.

A concentração de glicose e xilose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) liberadas após 72 h de sacarificação nos tratamentos realizados com a pré-incubação foram em  $\text{g.L}^{-1}$ : 4,37 e 1,25 para BSA 90 e 3,84 e 1,17 para BSA107, respectivamente. O uso de uma concentração maior de BSA não levou ao aumento de rendimento dos açúcares com esse tratamento. Ao contrário, o tratamento que promoveu melhor rendimento em glicose foi aquele utilizando a menor concentração de BSA, BSA90. Em relação à liberação de xilose, não

houve diferença estatística ( $\alpha= 5\%$ ) entre os tratamentos. As análises estatísticas foram feitas entre os tratamentos e entre cada tratamento e o controle.

Já para os tratamentos em que o BSA foi adicionado juntamente com o coquetel enzimático, sem incubação prévia, a liberação de glicose foi maior para o tratamento BSA107SI (4,63 g.L<sup>-1</sup>), enquanto que o tratamento BSA90SI, a concentração final de glicose foi de 3,06 g.L<sup>-1</sup>.

Os tratamentos mais eficientes, ou seja, aqueles que promoveram maior liberação de glicose foram nas condições de uso do BSA107SI e BSA90. De acordo com o teste estatístico utilizado, Tukey ( $\alpha=5\%$ ), as concentrações de glicose liberadas a partir desses tratamentos, BSA 107SI e BSA 90, não diferiram estatisticamente entre si, assim como para a liberação de xilose.

Dado o exposto, o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com 107 mg de BSA/ g lignina sem a etapa de pré-incubação foi definido como a condição mais eficiente, pois promoveu um aumento na liberação de açúcares 29% maior que o tratamento controle. Além disso, a eliminação da pré-incubação é também uma vantagem, visto que a retirada desta etapa torna o processo mais simples.

A avaliação da quantidade de açúcar liberado na sacarificação pode ser utilizada como um indicativo de bloqueio da lignina, devido ao fato de que ao se adicionar as proteínas não catalíticas, estas interagem com a lignina em substituição à interação enzima-lignina. Assim, a adsorção não produtiva das enzimas à lignina diminui e, por conseguinte o rendimento de hidrólise é aumentado (Saini *et al.*, 2016).

As vantagens da utilização do BSA, como agente bloqueador da lignina, está amplamente descrita na literatura. Kristensen *et al.* (2007) relataram que para a palha de trigo pré-tratada com ácido, a conversão de glicose na presença de BSA (0,05g/ g de matéria seca) aumentou cerca de 58%, e para a hemicelulose pré-tratada por explosão a vapor, o aumento foi de cerca de 11% na presença de BSA. Wang *et al.* (2013) demonstraram que na presença de BSA (1 mg.mL<sup>-1</sup>) e com uma carga enzimática de 5 FPU/g de celulose, após 72 h de hidrólise enzimática do papel de filtro, a produção de glicose aumentou em 40,14 %. A quantidade de glicose gerada a partir de um pré-

tratamento drástico como NaOH 1 M, 2,3g.L<sup>-1</sup>, foi praticamente a mesma que a de um tratamento mais brando (NaOH 0,5 M) na presença de BSA, como foi mostrado por Wang, Kobayashi e Mochidzuki (2015). Neste mesmo estudo, foram avaliadas proteínas que apresentam um menor custo como alternativa ao uso do BSA, proteína que possui um custo elevado, como o extrato de levedura e a peptona, sendo observado que essas proteínas promoveram um rendimento de glicose melhor (13% maior) que o rendimento obtido quando foi utilizado o BSA.

As condições de utilização de 107 mg proteína/ g lignina, sem a etapa de pré-incubação do bagaço de cana-de-açúcar com esta proteína foi então selecionada e utilizada nos experimentos para avaliação da eficiência do soro de leite, como fonte de proteína não catalítica, para o bloqueio da biomassa.

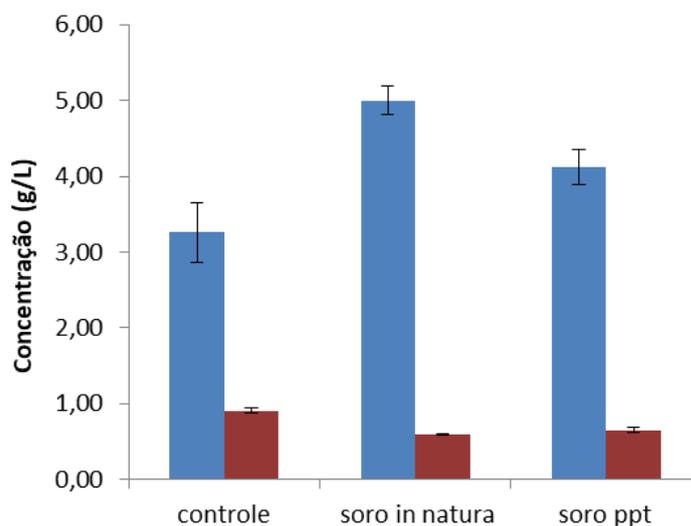
#### **5.4. Bloqueio da lignina com soro de leite**

Diversos trabalhos descritos na literatura relatam o uso de proteínas não catalíticas de baixo custo para substituir os agentes bloqueadores químicos e de custo elevado como o BSA, Tween e PEG (Wang, Kobayashi e Mochidzuki, 2015; Florencio *et al.*, 2016).

Devido à grande disponibilidade, baixo custo e composição rica em proteínas e aminoácidos, o soro de leite é um coproduto com grande potencial de aplicação para atuar como possível agente bloqueador da lignina. Em vista disso, neste estudo, avaliamos a utilização do soro de leite na concentração de 107 mg de proteína/g de lignina. Esta concentração foi escolhida por ter promovido um bom resultado no experimento de sacarificação conduzido na presença de BSA.

Para isto, foi utilizado o soro de leite *in natura* e também as proteínas precipitadas do soro de leite. O processo de precipitação foi realizado a fim de se obter apenas as proteínas presentes no soro, pois como mostrado por Siso, (1996) e Guimarães, *et al.*, (2010). O soro de leite apresenta uma composição diversificada, com grande concentração de lactose e outras moléculas que poderiam interferir no processo de interação das suas proteínas com a lignina alterando o seu possível bloqueio. As

concentrações de glicose e xilose obtidas a partir da sacarificação do bagaço de cana, na presença do soro de leite *in natura* e do soro de leite precipitado estão apresentadas na Figura 2.



**Figura2:** Sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, na presença do soro de leite *in natura* e precipitado na concentração de 107 mg proteína/g de lignina. Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de glicose (■) e xilose (■) geradas após 72 h de hidrólise.

A quantidade de glicose liberada após 72 h de sacarificação do bagaço de cana na presença de soro de leite *in natura* e precipitado foram maiores 53% e 26% respectivamente, do que a concentração de glicose gerada a partir do experimento controle, na ausência dessas proteínas não catalíticas. Wang, Kobayashi e Mochizuki, (2015) e Florencio *et al.*, (2016) reportaram um aumento de apenas 13,5 e 13,7% na liberação de glicose quando o extrato de levedura e peptona foram utilizados como proteínas não catalíticas respectivamente; e um aumento de aproximadamente duas vezes na concentração de glicose gerada, quando se utilizou a proteína de soja.

O melhor desempenho de hidrólise enzimática utilizando-se o soro *in natura* e precipitado poderia ser explicado pela adsorção das proteínas e outros componentes do soro de leite sobre a lignina, o que possivelmente impediu a adsorção inespecífica das celulases, levando a uma melhor eficiência das enzimas e consequentemente, maiores rendimentos de hidrólise. A concentração de glicose liberada foi superior no ensaio de

sacarificação utilizando-se o soro de leite *in natura*, comparado aquele utilizando o soro de leite precipitado. Este resultado é também interessante, uma vez que a utilização do soro de leite *in natura* evita a etapa de precipitação, tornando o processo mais simples e menos oneroso.

Para avaliar se a glicose liberada a partir da sacarificação do bagaço de cana na presença do soro de leite foi oriunda exclusivamente do processo de hidrólise da biomassa e não da hidrólise da lactose presente no soro de leite, foi avaliada a atividade de  $\beta$ -galactosidase possivelmente presente no *blend* enzimático. Esta enzima catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas entre a glicose e a galactose formadoras da lactose. Não foi detectada a atividade de  $\beta$ -galactosidase na mistura enzimática e em nenhuma das alíquotas retiradas durante o período de sacarificação (0, 24,48 e 72 h). Além disso, concentração de glicose final foi obtida a partir da relação entre a concentração de glicose no tempo zero e no tempo de 72 h, desta forma eliminamos a interferência da possível concentração de glicose presente inicialmente no ensaio, oriunda do soro ou dos demais componentes do ensaio - no entanto, não foi detectada a presença de glicose no tempo zero -. Dessa forma, foi confirmado que a glicose quantificada ao final da sacarificação foi proveniente exclusivamente da hidrólise do bagaço de cana.

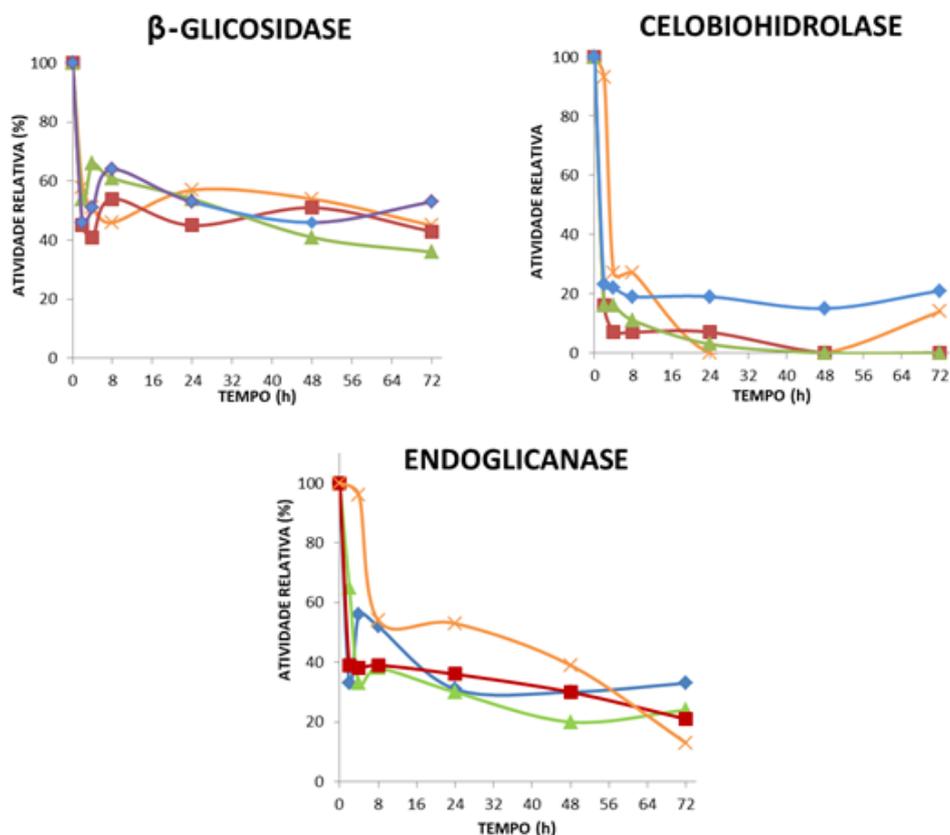
A presença de lactose e galactose, oriundas do soro de leite, no hidrolisado da sacarificação é positiva para a etapa de fermentação e produção de etanol, pois esses açúcares juntamente com a glicose e frutose são fermentados por diversas leveduras, de forma direta ou indireta, incluindo a *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* (Andrade, 2005). Kumar *et al.* (1998) realizaram a cofermentação de produtos de padaria suplementados com soro de leite, e obtiveram um aumento de 36,5% do rendimento de etanol. Ferreira (2003) realizou fermentação do soro de leite com a levedura *K. marxianus*, a 40° C durante 8h, para obtenção de etanol, atingindo uma produtividade de 2,73 g.L<sup>-1</sup> de etanol. Em vista disso, podemos propor que os açúcares do soro de leite poderiam ser utilizados para aumentar ainda mais o rendimento da fermentação e produção de etanol.

## 5.5. Efeito das proteínas bloqueadoras sobre a estabilidade enzimática

As enzimas hidrolíticas utilizadas durante a etapa de sacarificação da biomassa sofrem influência de vários fatores, principalmente das interações inespecíficas e não produtivas entre enzimas e os componentes do bagaço, especialmente a lignina; da inibição das enzimas pelos produtos de hidrólise e por compostos gerados durante o pré-tratamento das biomassas; e também pela perda da estabilidade das enzimas em função da temperatura e tempo de exposição (termoestabilidade) (Jørgensen; Kristensen; Felby, 2007). A perda da atividade enzimática devido à baixa termoestabilidade das enzimas durante os ensaios de sacarificação é um fator relevante, devido aos ensaios ocorrerem durante 72 h, com temperatura em torno de 50° C. Esta perda, associada com a diminuição da atividade por adsorção, ocasiona em uma menor eficiência das misturas enzimáticas.

De acordo com Zheng *et al.* (2013) as taxas de adsorção enzimática na celulose e na lignina podem variar com a temperatura. Em temperaturas elevadas como a temperatura de sacarificação (50 °C), as enzimas adsorvem mais rapidamente à celulose, em detrimento à adsorção sobre a lignina. Os autores mostraram ainda, que a adsorção à celulose, nesta temperatura foi 10 vezes maior do que a 4° C.

A fim de avaliar a influência das proteínas não catalíticas sobre a estabilidade das enzimas presentes na mistura enzimática entre *C. cubensis*:*P. pinophilum*, foram realizados os ensaios de termoestabilidade a 50° C, dos extratos na presença do soro *in natura*, do soro precipitado e do BSA na concentração de 107 mg sendo avaliadas as atividades das principais celulasas e hemicelulasas durante o período de incubação (Figuras 3 e 4).

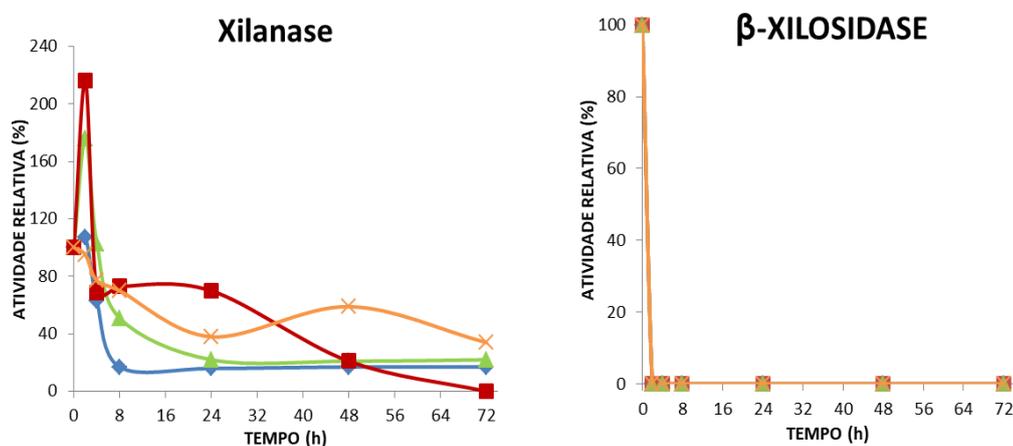


**Figura 3:** Efeito da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -glicosidase, celobiohidrolase e endoglucanase da mistura enzimática. As soluções contendo as enzimas foram incubadas a 50° C por 72 h na presença das diferentes proteínas não catalíticas. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade inicial como 100%. Controle (—◆—); Soro *in natura* (—■—); Soro precipitado (—×—); BSA (—▲—).

A atividade relativa de celobiohidrolase foi de apenas 10%, já nas primeiras horas de incubação na presença do soro de leite *in natura* e do BSA, enquanto que na ausência de proteínas catalíticas essa atividade ficou em torno de 20% durante todo o período de incubação. Já para o soro precipitado a atividade nas primeiras horas foi um pouco maior do que para as demais proteínas. Esta enzima teve um comportamento atípico, em que nas horas finais de ensaio houve um aumento de atividade não explicado, na presença de soro precipitado e no controle. Portanto, possivelmente os agentes bloqueadores não exerceram efeito estabilizante atuando de forma a minimizar a perda de atividade enzimática.

A  $\beta$ -glicosidase manteve sua atividade em cerca de 50% da atividade inicial durante as 72 h de incubação tanto na ausência quanto na presença das proteínas não catalíticas. Já para a endoglicanase, a atividade relativa observada na presença do soro precipitado foi cerca de 60 e 50% nas primeiras 48 horas. Já na presença das outras proteínas a atividade relativa foi menor, em torno de 40% até às 72 h de ensaio.

Rodrigues *et al.* (2014) analisaram o efeito da temperatura de 50° C sobre as atividades das enzimas do coquetel Celluclast 1.5L e Novozymes 188 e reportaram que após 24 h de incubação, as enzimas  $\beta$ -glicosidase, celobiohidrolase e endoglucanase apresentaram 85%, 66% e 64% de sua atividade inicial, respectivamente.



**Figura 4:** Efeito da temperatura na estabilidade das xilanases e  $\beta$ -xilosidases da mistura enzimática. As soluções contendo as enzimas foram incubadas a 50° C por 72 h na presença das diferentes proteínas não catalíticas. As atividades relativas foram calculadas considerando-se a atividade inicial como 100%. Controle (●); Soro *in natura* (■); Soro precipitado (×); BSA (▲).

Como mostrado na Figura 6, a atividade de  $\beta$ -xilosidase é reduzida drasticamente já nas duas primeiras horas de incubação a 50 °C para todos os tratamentos. Esse resultado indica que a termoestabilidade desta enzima é baixa a 50° C e as proteínas não catalíticas não foram capazes de exercer um efeito estabilizante contra os fatores externos que levam à perda de atividade.

As xilanases são conhecidas por apresentarem baixa estabilidade térmica e diversos autores mostram isso em seus estudos como, a xilanase de *Cryptococcus*

*adeliae* que perdeu 71 % e 95 % de sua atividade em 5 min, após incubação a 40 °C e 50° C, respectivamente (Gomes; Gomes; Steiner, 2000). A xilanase de *Bacillus tequilensis* da cepa ARMATI reteve 51% de sua atividade inicial após 4 h de incubação a 60° C, (Khusro *et al.*, 2016). A xilanase da mistura enzimática *C. cubensis*:*P. pinophilum* apresentou um pico de atividade aproximadamente duas vezes maior que a atividade inicial, na presença de BSA e soro de leite precipitado, no início da incubação, sugerindo assim, um efeito ativador dessas proteínas sobre a xilanase. Entretanto, este desempenho não foi mantido ao longo da incubação, e nas primeiras 24 h, a atividade relativa na presença de BSA foi de 20% e de 70% na presença do soro de leite precipitado. Na presença do soro de leite *in natura*, a atividade residual da xilanase, manteve-se em 60 % até 48 h de incubação.

Portanto, pode-se sugerir que algumas enzimas do coquetel enzimático de *C. cubensis*: *P. pinophilum* são mais sensíveis à temperatura que as enzimas dos coquetéis comerciais, uma vez que esses coquetéis apresentam em sua composição diversos fatores estabilizantes que protegem as enzimas contra efeitos desativadores (Maitan-Alfnas, *et al.*, 2015). Vários fatores podem promover redução na atividade enzimática durante o processo de sacarificação da biomassa, por isso sugerimos que a atividade perdida foi devido à perda pela adsorção improdutiva das enzimas e também pode ocorrido perda devido à desnaturação pelo calor ou agitação mecânica durante a sacarificação, porém é difícil mensurar a perda relacionada a cada um desses fatores (Jørgensen; Kristensen; Felby, 2007; Jørgensen e Pinelo, 2016; Lu *et al.*, 2002) e por isso os ensaios de termo estabilidade foram usados como uma espécie de controle.

## **5.6. Proteínas totais livres antes e após a sacarificação**

De modo a verificar a adsorção das proteínas totais (do *blend* enzimático dos extratos de *C. cubensis* e *P. pinophilum* e das proteínas não catalíticas), no bagaço de cana, foram realizados experimentos de sacarificação dos quais alíquotas do sobrenadante de cada tratamento foram retiradas em t0 e t72 h, centrifugadas e o conteúdo de proteínas presentes no sobrenadante foi quantificado. Na tabela 3 estão

apresentadas as concentrações de proteínas livres durante a hidrólise do bagaço, na presença do soro de leite e no experimento controle.

**Tabela 3:** Análise de proteínas totais livres ( $\mu\text{g/mL}$ ), ao início da hidrólise e ao final de 72 h. As concentrações foram baseadas na quantificação de proteínas livres no sobrenadante.

	Proteína Livre ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		Proteína livre após 72 h (%)
	t0	t72 h	
Controle	99,2 $\pm$ 0,03	32,72 $\pm$ 0,013	32,98
BSA	681,8 $\pm$ 0,04	35,83 $\pm$ 0,016	5,25
Soro <i>in natura</i>	673,03 $\pm$ 0,003	184,58 $\pm$ 0,013	27,43

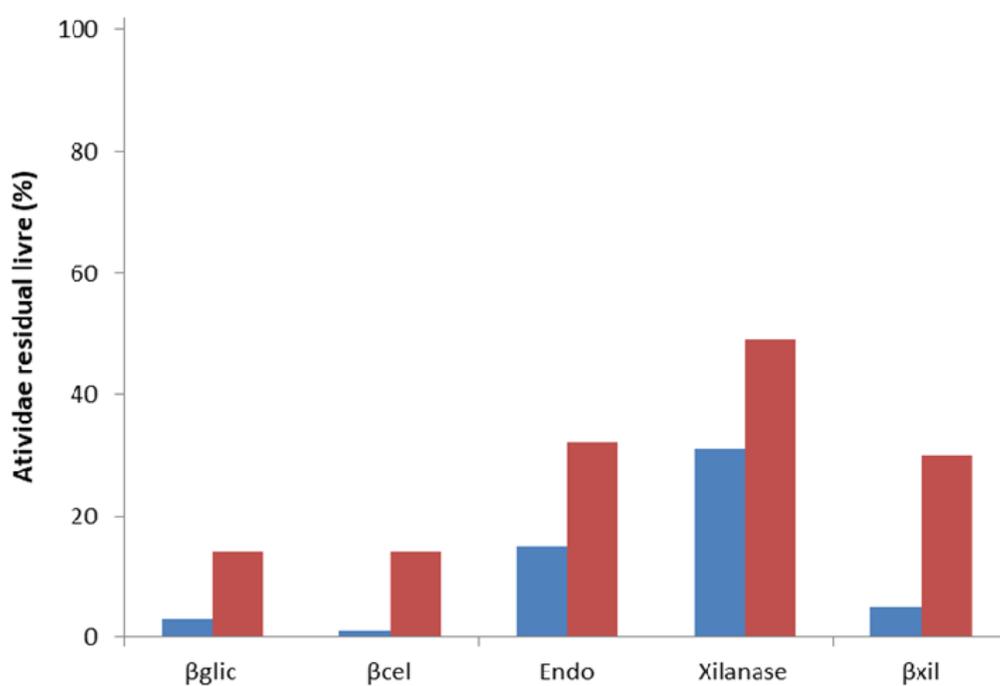
No experimento controle, na ausência das proteínas não catalíticas, o total de proteínas correspondia às proteínas do extrato enzimático e aquelas da própria biomassa, que perfazem uma baixa concentração proteica. Assim, ao final das 72 h, 67,02 % das proteínas não estavam livres no sobrenadante da reação, ou seja, na ausência das proteínas não catalíticas, grande parte das proteínas ativas (enzimas) possivelmente estava adsorvida inespecificamente na biomassa.

Nos tratamentos utilizando as proteínas não catalíticas BSA e proteínas do soro de leite *in natura*, na concentração de 107 mg proteína/ g lignina, as proteínas livres no sobrenadante do ensaio de sacarificação ao final de 72 h correspondiam a 5,25 %, 27,43% respectivamente. Estes resultados indicam que o BSA foi a proteína possivelmente mais adsorvida.

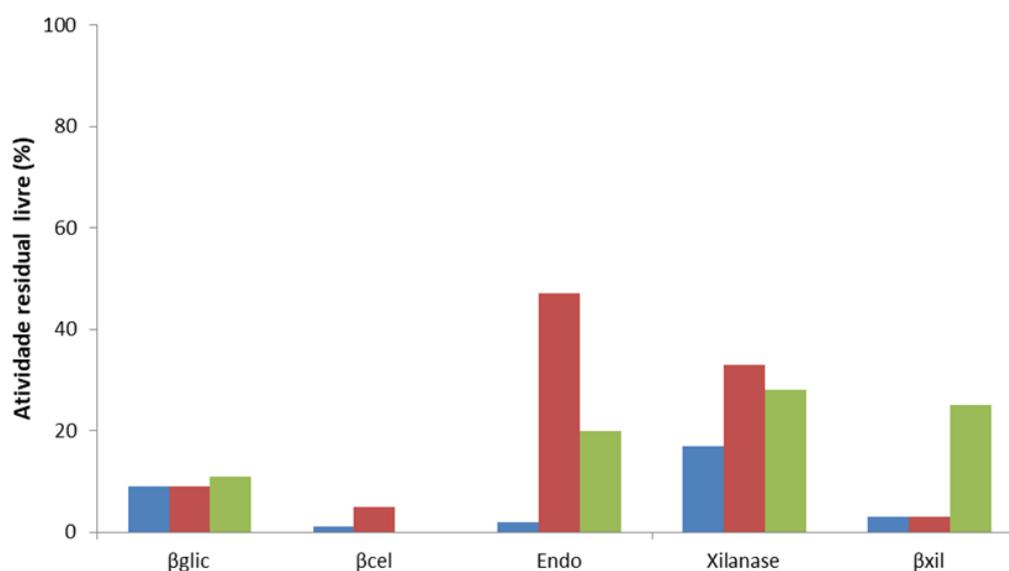
A quantificação de proteínas livres para o tratamento com soro de leite precipitado em t0 foi de 297,75 $\pm$ 0,006, valor esse bem diferente do encontrado para os outros tratamentos por isso não conseguimos comprar este resultado com os demais. Como neste tratamento utilizamos a proteína precipitada, pode ter havido falhas ao ressuspendê-la e isso levou a adição de aglomerados proteicos que em t0 não estavam solúveis no meio reacional e dessa forma não puderam ter suas atividades quantificadas.

### 5.7. Análises das atividades enzimáticas livres durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar

A determinação das atividades enzimáticas no sobrenadante do ensaio de sacarificação do bagaço de cana na presença das proteínas BSA, soro de leite *in natura* e precipitado, após as 72 h de hidrólise foi realizada e as atividades residuais refletem as enzimas ativas, livres no sobrenadante, após o período de sacarificação. Figuras 5 e 6:



**Figura 5:** Atividade residual de enzimas livres no sobrenadante ao final da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar diante do tratamento com BSA. Porcentagem de atividade enzimática no sobrenadante após 72h de hidrólise a 50° C. Controle (■) e tratamento com BSA (■). Atividade inicial das enzimas no extrato enzimático foi estipulada como 100 %.



**Figura 6:** Atividade residual de enzimas livres no sobrenadante ao final da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar diante dos tratamentos com soro de leite. Porcentagem de atividade enzimática no sobrenadante após 72 h de hidrólise a 50° C. Controle (■), tratamento com soro *in natura* (■), tratamento com soro precipitado (■), após 72 h de hidrólise a 50° C. Atividade inicial das enzimas no extrato enzimático foi estipulada como 100 %.

De uma forma geral, as atividades enzimáticas da endoglucanase, xilanase e β-xilosidase presentes nos sobrenadantes dos tratamentos com soro de leite (precipitado e *in natura*) foram maiores do que no tratamento na ausência da proteína não catalítica. Isto indica que estas enzimas presentes no sobrenadante estão livres para hidrolisar o substrato e assim, liberar os monômeros de açúcares. Esse resultado justifica os melhores rendimentos de glicose encontrados nos tratamentos com soro de leite quando comparado ao tratamento controle (Figura 2).

A enzima β-glicosidase, apresentou a mesma atividade no sobrenadante nos tratamentos com soro de leite precipitado e *in natura* e no tratamento controle, na ausência do soro. Isto sugere que o modo como esta enzima interage com o substrato é diferentes das demais, devido possivelmente, à ausência do domínio CBD. Este resultado é compatível com a literatura, como no estudo realizado por Ko *et al.* (2015) no qual foi mostrado que a β-glicosidase adsorveu fortemente na lignina, sendo que apenas 2-18% da atividade inicial desta foi encontrada no sobrenadante. Assim como foi observado neste trabalho, em que apenas cerca de 10% da atividade enzimática inicial foi quantificada no sobrenadante, ou seja, a maior parte desta enzima

possivelmente encontra-se adsorvida ao final do período de hidrólise da biomassa, e/ou ocorrem perdas de atividade por fatores externos, como agitação mecânica e temperatura.

A celobiohidrolase mostrou um comportamento diferente entre os tratamentos com o soro de leite. No tratamento com o soro *in natura*, houve um aumento da sua atividade no sobrenadante em cerca de 65%. Já para o tratamento com o soro precipitado ocorreu o oposto, a atividade da enzima livre no sobrenadante caiu para 12% da atividade determinada no controle. Sipos *et al.* (2010) mostraram que a adição de PEG 400, faz com que as duas celobiohidrolases de *T. reesei* Cel7A (CBH I) e Cel6A (CBH II) presentes no extrato enzimático, fiquem mais livres (50-70%) no sobrenadante da hidrólise de abeto. Para a celobiohidrolase de *H. jecorina*, apenas 10% desta encontrava-se livre em solução após a hidrólise de madeira de pinheiro pré-tratada a vapor (Börjesson *et al.*, 2007). Com essa diferença observada, podemos sugerir que o soro de leite precipitado foi menos eficiente no bloqueio da lignina, permitindo ainda a interação entre as celobiohidrolases e a lignina.

As demais atividades enzimáticas avaliadas apresentaram valores maiores no sobrenadante para ambos os tratamentos com soro de leite, comparando-se ao controle. A atividade de endoglicanase foi 24 vezes maior no sobrenadante do tratamento com soro *in natura* e quase 10 vezes maior no tratamento com o soro precipitado, em relação ao tratamento controle, sem adição de proteínas não catalíticas. Estes resultados indicam que possivelmente, ambos os tratamentos foram eficientes para minimizar a interação destas enzimas com a lignina. Este resultado está em concordância com o observado por Kristensen *et al.* (2007), onde foi mostrado que na presença de todos os surfactantes testados por ele e para diferentes pré-tratamentos da biomassa, a atividade de endoglicanase no sobrenadante da sacarificação aumentava em pelo menos 25% e quando foi usada a proteína não catalítica, BSA este aumento variava entre 20-25%.

Para as hemicelulases xilanases e  $\beta$ -xilosidase, o perfil de atividade foi semelhante. Na presença de soro *in natura* houve um aumento de atividade, em cerca de 90% e na presença do soro precipitado este aumento foi de 59%. No caso da  $\beta$ -xilosidase, sua atividade aumentou em quase 9 vezes quando o tratamento com o soro

precipitado foi utilizado e 47% na presença do soro *in natura*. Florencio *et al.* (2016) mostrou que a atividade de xilanase na presença da proteína de soja como proteína não catalítica, aumentava significativamente após 24h de hidrólise. Ge *et al.* (2014) também mostraram que a adsorção de xilanase em farinha de milho pré-tratada com amônia diminuiu com a adição de PEG 2000, PEG 6000 e Tween 20, sugerindo que essa diminuição da adsorção poderia ocorrer tanto pela diminuição da adsorção na lignina quanto na xilana.

As atividades das enzimas quantificadas no sobrenadante, quando foi utilizado o BSA como proteína não catalítica, estão apresentadas na Figura 3. As atividades residuais no sobrenadante das reações de sacarificação do bagaço de cana foram razoavelmente maiores na presença de BSA, se comparado aos tratamentos com o soro de leite, com exceção da atividade de endoglucanase presente no tratamento com soro precipitado. Mesmo com essa diferença de adsorção, pode ser observado que o rendimento de hidrólise na presença do soro foi melhor do que na presença do BSA. Isto sugere que a presença da endoglucanase em maior quantidade no sobrenadante pode ter levado a essa diferença de rendimento, corroborando com o fato de que esta enzima é uma das mais importantes na hidrólise da celulose.

### **5.8. Discussão geral**

Nos estudos de Yang e Wyman (2006) a quantidade de proteínas livres no sobrenadante do ensaio de sacarificação foi avaliada, e os autores observaram que na ausência da proteína não catalítica a concentração de proteínas livres no sobrenadante passou de 0,26 mg.mL<sup>-1</sup> para 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> em poucas horas, e a presença de BSA fez com que a concentração de proteínas livres, 1,2 mg.mL<sup>-1</sup> adicionados inicialmente, passasse para 0,21 mg.mL<sup>-1</sup> ao final de 48 h de hidrólise, indicando a adsorção desta proteína à biomassa. Os autores sugeriram que o BSA atua de forma a bloquear a lignina e diminuir a adsorção entre esta e as celulasas. Este resultado está em concordância com o encontrado em nosso estudo, tanto para o BSA quanto para os tratamentos com o soro de leite. Desta forma, a maior adsorção das proteínas do soro de leite *in natura* poderia explicar a maior liberação de glicose a partir da sacarificação do bagaço de cana na presença desta proteína (Fig. 2).

A avaliação das atividades enzimáticas residuais no sobrenadante dos ensaios de sacarificação é interessante porque o bloqueio dos sítios de interação da lignina pelas proteínas não catalíticas ocasiona um aumento na presença das enzimas no sobrenadante e conseqüentemente uma maior de atividade enzimática é detectada. Nos ensaios realizados destacamos a endoglicanase, pois esta enzima teve detectada maior atividade no sobrenadante quando foram utilizadas as proteínas bloqueadoras, passando de cerca de 0,053 U/mL no controle, para 0,51 e 1,20 U/mL nos tratamentos com soro *in natura* e precipitado, respectivamente.

Desta fora, os efeitos positivos das proteínas não catalíticas testadas podem estar relacionado à adsorção dessas sobre a biomassa, principalmente na lignina, bloqueando seus sítios de interação inespecífica com as enzimas. Adicionalmente, a presença das proteínas não catalíticas pode promover a estabilização das enzimas melhorando ainda mais o desempenho da hidrólise (Eriksson, Borjesson, Tjerneld; 2002).

O presente trabalho indica que o uso do soro de leite como um potencial agente bloqueador da lignina, exerce efeito positivo na sacarificação do bagaço de cana, pois permite que as enzimas fiquem livres no meio reacional atuando de forma mais efetiva sobre a celulose. Isto ocorre possivelmente pela interação do soro de leite com a lignina de forma a impedir a adsorção não produtiva das enzimas.

6- Conclusão

---

## 6. CONCLUSÕES

Concluimos com este trabalho que o uso de soro de leite como possível agente de bloqueio da lignina presente na biomassa, para a produção de etanol de segunda geração tem grande potencial de aplicação. Os resultados indicaram que a eficiência de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelo extrato enzimático de *C. cubensis*:*P. pinophilum* na presença do soro de leite aumentou entre 26-53%, sugerindo que o soro foi eficiente para diminuir a adsorção inespecífica de celulasas e hemicelulasas sobre a lignina, e desta forma aumentar a atividade das enzimas livres no sobrenadante do hidrolisado. Além disso, a termoestabilidade das enzimas xilanase e endoglicanase foram maiores na presença das proteínas não catalíticas do soro.

7- Perspectivas

---

## **7. PERSPECTIVAS**

A etapa de fermentação aplicada logo após a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar na presença do soro de leite deverá ser realizada a fim de avaliar o impacto do uso dessas proteínas no rendimento final de etanol. Além disso, a investigação das possíveis interações existentes entre o soro de leite e o bagaço de cana-de-açúcar auxiliará na melhor compreensão do comportamento de adsorção das enzimas sobre a biomassa.

## 8-Referências Bibliográficas

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. In: (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**: Elsevier, v.82, p.1-28, 2013.

ANDRADE, A. C. D. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. 2005.

ALVES; M. P., MOREIRA, R.O., JÚNIOR P. H. R., MARTINS, M. C., PERRONE, Í. T., CARVALHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.

ÁZAR, R. I. L.; MORGAN T.; DOS SANTOS A.C.F.; DE AQUINO X. E.; LADISCH M.R.; GUIMARÃES V.M. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. **Enzyme and microbial technology**, v. 109, p. 25-30, 2018.

BANERJEE, S.; MUDLIAR S.; SEN R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY R.A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.

BONAWITZ, N. D. *et al.* Disruption of Mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient Arabidopsis mutant. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 376, 2014.

BÖRJESSON, Johan *et al.* Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology** v. 41, n. 1–2, p. 186–195, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRETHAUER, S., STUDER, M.H., YANG, B., WYMAN, C.E. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. **Bioresource Technology**. 102, 6295–6298, 2011.

CONAB. 2017. Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/cana/safra/conab-2-levantamento-safra-2017-18-cana-de-acucar-240817/> >. Acesso em: 01/ 18.

DE ALMEIDA, C. C.; JÚNIOR, C. A. C.; DE OLIVEIRA, A. C. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, N.16; p.1841 2013.

- ERIKSSON T, BORJESSON J, TJERNELD F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology** 31(3): 353–364, 2002.
- FALKOSKI, D. L. *et al.* Chrysosporthe cubensis: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.
- FERREIRA, R. M. Produção de etanol a partir de soro de queijo utilizando a levedura Kluyveromyces marxianus. Tese de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.
- FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 221, p. 172-180, 2016.
- GAO, D. *et al.* Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 175, 2014.
- GE, X. *et al.* Enhanced xylanase performance in the hydrolysis of lignocellulosic materials by surfactants and non-catalytic protein. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2106-2118, 2014.
- GLASS, N. L. *et al.* Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 477-498, 2013.
- GOMES, D. *et al.* Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4131-4143, 2015.
- GOMES, J; GOMES, I; STEINER, W. Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast Cryptococcus adeliae: production and properties. *Extremophiles: life under extreme conditions* v. 4, n. 4, p. 227–35, 2000.
- GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in life sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.
- GUIMARÃES, L. M. D. S. *et al.* Genetic control of Eucalyptus urophylla and E. grandis resistance to canker caused by Chrysosporthe cubensis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 525-531, 2010.
- GUIMARÃES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

GURGEL, L. V. A.; PIMENTA, M. T. B.; DA SILVA CURVELO, A. A. Enhancing liquid hot water (LHW) pretreatment of sugarcane bagasse by high pressure carbon dioxide (HP-CO<sub>2</sub>). **Industrial crops and products**, v. 57, p. 141-149, 2014.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. D. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.

HODGSON, K. T.; BERG, J. C. Dynamic wettability properties of single wood pulp fibers and their relationship to absorbency. **Wood and fiber Science**, v. 20, n. 1, p. 3-17, 2007.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497-4559, 2015.

JIN, W. *et al.* Tween-80 is effective for enhancing steam-exploded biomass enzymatic saccharification and ethanol production by specifically lessening cellulase absorption with lignin in common reed. **Applied Energy**, v. 175, p. 82-90, 2016.

JØRGENSEN, H.; PINELO, M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, n. 1, p. 150-167, 2017.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** v. 1, p. 119–134, 2007.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

KIM, Y. *et al.* Hydrolysis-determining substrate characteristics in liquid hot water pretreated hardwood. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 677-687, 2015.

KHUSRO, A. *et al.* Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. **Electronic Journal of Biotechnology** v. 22, n. 2015, p. 16–25, 2016.

KO, J. K. *et al.* Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 447-456, 2015.

KRICKA, W.; FITZPATRICK, J.; BOND, U. Metabolic engineering of yeasts by heterologous enzyme production for degradation of cellulose and hemicellulose from biomass: a perspective. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 174, 2014.

KRISTENSEN, J. B. *et al.* Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 888-895, 2007.

- KUMAR, J. V.; MATHEW, R.; SHAHBAZI, A. Bioconversion of solid food wastes to ethanol. **Analyst**, v. 123, n. 3, p. 497-502, 1998.
- LE FLOCH, A.; JOURDES, M.; TEISSEBRE, P.-L. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. **Carbohydrate research**, v. 417, p. 94-102, 2015.
- LI, X.; ZHENG, Y. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 4, p. 466-489, 2017.
- LIMA, M. A. *et al.* Aspergillus niger  $\beta$ -Glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape. **Journal of Biological Chemistry**, v. 2013, n. 288, p. 32991-33005, 2013.
- LIMA, M. A. *et al.* Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 10, 2014.
- LIU, H. *et al.* Toward a fundamental understanding of cellulase-lignin interactions in the whole slurry enzymatic saccharification process. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 5, p. 648-663, 2016.
- LU, Yanpin *et al.* Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied biochemistry and biotechnology** v. 98–100, p. 641–654, 2002
- MAITAN-ALFENAS, G. P. *et al.* The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource technology**, v. 192, p. 670-676, 2015.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.
- MAITY, A. *et al.* *Penicillium pinophilum*—A novel microorganism for nutrient management in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 169, p. 111-117, 2014.
- MARABEZI, K. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo, 2009.
- MENEGOL, D. *et al.* Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1252-1256, 2014.

- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, n. 5, p. 871-879, 2010.
- PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 27, p. 201-212, 2005
- PENG, F. *et al.* Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879-903, 2012.
- PITARELO, A. P. *et al.* Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.
- RAHIKAINEN, J. L. *et al.* Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 5, p. 315-321, 2013.
- ROCHA, G. J. *et al.* Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.
- ROCHA, M. H. *et al.* Life cycle assessment (LCA) for biofuels in Brazilian conditions: a meta-analysis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 435-459, 2014.
- RODRIGUES, A. C.; FELBY, C.; GAMA, M. Cellulase stability, adsorption/desorption profiles and recycling during successive cycles of hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 156, p. 163-169, 2014.
- SAINI, J. K. *et al.* Cellulase adsorption on lignin: a roadblock for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, v. 98, p. 29-42, 2016.
- SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.
- SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SCHNEIDER, W. D. H. *et al.* Penicillium echinulatum secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 66, 2016.

- SEO, D.-J.; FUJITA, H.; SAKODA, A. Structural changes of lignocelluloses by a nonionic surfactant, Tween 20, and their effects on cellulase adsorption and saccharification. **Bioresource technology**, v. 102, n. 20, p. 9605-9612, 2011.
- SIPOS, B. *et al.* Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly (ethylene glycol). **Enzyme and microbial technology**, v. 47, n. 3, p. 84-90, 2010.
- SIQUEIRA, G. *et al.* Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 176, 2017.
- SISO, M. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.
- SOREK, N. *et al.* The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, v. 64, n. 3, p. 192-201, 2014.
- VISSER, E. M. *et al.* Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 144, p. 587-594, 2013.
- VU, V. V.; MARLETTA, M. A. Starch-degrading polysaccharide monooxygenases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 14, p. 2809-2819, 2016.
- WANG, H. *et al.* The effect of nonenzymatic protein on lignocellulose enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 287-299, 2015.
- WANG, H.; KOBAYASHI, S.; MOCHIDZUKI, K. Effect of non-enzymatic proteins on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of different lignocellulosic materials. **Bioresource technology**, v. 190, p. 373-380, 2015.
- WANG, H. *et al.* Effect of bovine serum albumin (BSA) on enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 541-551, 2013.
- WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemical Journal**, v. 260, n. 1, p. 37-43, 1989.
- YANG, B.; Wyman, C. E. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 94, n. 4, July 5, 2006.
- ZHENG, Y. *et al.* Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Journal of biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 135-143, 2013.

